

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

ACTIVIDAD ALEXITERA DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y  
*Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) SOBRE EL VENENO DE  
*Bothrops atrox* (“Pitalala”)

AUTORA:

KAREN PRISCILA LEÓN CÁRDENAS

TUTOR:

WILSON FABIÁN TAPIA HERNÁNDEZ

Quito, septiembre 2017

### **Cesión de derechos de autor**

Yo, Karen Priscila León Cárdenas, con documento de identificación N ° 1725809501 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que yo soy la autora del trabajo de grado titulado: ACTIVIDAD ALEXITERA DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) SOBRE EL VENENO DE *Bothrops atrox* ("Pitalala"), mismo que ha sido desarrollado para optar el título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos anteriormente mencionados.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo éste documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Karen Priscila León Cárdenas

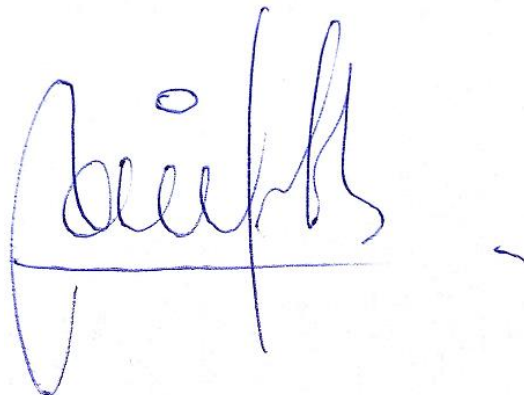
Cédula: 172580950-1

Fecha: Quito, julio del 2017

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor**

Yo, Wilson Fabián Tapia Hernández, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación ACTIVIDAD ALEXITERA DE *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) SOBRE EL VENENO DE *Bothrops atrox* ("Pitalala"), realizado por Karen Priscila León Cárdenas, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerada como trabajo final de titulación.

Quito, julio del 2017



Wilson Fabián Tapia Hernández

Cédula de identidad: 040094281-9

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar mi trabajo de titulación a mi madre, quien me ha brindado su confianza, su apoyo incondicional durante todos estos años, celebrando mis triunfos, acompañándome en mis derrotas, brindándome sus palabras de aliento; por todo eso y más, le dedico especialmente éste logro. Gracias mamá.

A mis abuelitos Jorge y Beatriz, por ayudarme a vencer mis obstáculos; gracias abuelita sus palabras de aliento, por enseñarme a ser una mujer de bien con su ejemplo, por demostrarme su cariño hasta el último suspiro.

A mi hermano por estar presente en los momentos más difíciles a mi lado, ayudándome y levantándome.

A mi primo Nicolás quien ha sido mi fuente de inspiración para llegar a ésta etapa tan importante de mi vida, con sus travesuras y ocurrencias llena mi vida de alegría y felicidad.

Infinitas gracias a mi familia quien ha sido el motor de mi vida, a ellos les dedico mis triunfos, alegrías y metas cumplidas. ¡Gracias!

## **Agradecimiento**

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana quien posibilitó mi formación profesional, a sus Docentes y Personal Administrativo y de Servicios.

De manera muy especial agradezco a mi tutor, Químico Farmacéutico Wilson Tapia Hernández quien, con su empeño, dedicación, perseverancia y, sobre todo, su profesionalismo, me brindó la oportunidad de realizar ésta investigación. Infinitas gracias por su apoyo incondicional en ésta etapa tan importante de mi vida. Al profesor Christian Larenas por su importante colaboración en el análisis de los resultados.

A las personas quienes trabajan en el Laboratorio de Ciencias de la Vida, quienes me ayudaron con la prestación de equipos e instalaciones y su ayuda profesional cuando fue necesario.

A todos, infinitas gracias.

## Tabla de contenido

Capítulo I.....	3
Marco Conceptual .....	3
1.1 Antecedentes. ....	3
1.2 Química de las plantas alexíteras .....	4
1.3. Especies vegetales estudiadas.....	4
1.3.1 <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina) .....	5
1.3.2 <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav (Kunapi) .....	8
1.4 Serpientes .....	10
1.4.1 Generalidades.....	10
1.5 Serpientes en el Ecuador .....	10
1.6 Género Bothrops.....	11
1.7 <i>Bothrops atrox</i> .....	12
1.7.1 Generalidades.....	12
1.7.2 Hábitat y distribución.....	13
1.8 Accidente bothrópico .....	14
1.8.1 Generalidades.....	14
1.8.2 Cuadro clínico.....	15
1.9 Alteración de los mecanismos de la Homeostasia y Coagulación sanguínea. .	16
1.9.1 Hemólisis .....	17
1.9.2 Coagulación sanguínea .....	18
1.9.3 Proteólisis.....	20

1.10. Perfil electroforético del veneno de <i>B. atrox</i> .....	20
1.10.1 Electroforesis en gel .....	20
1.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).....	21
1.10.3 Sistemas de tampón .....	23
1.11 Tratamiento antiofídico.....	24
Capítulo II .....	26
Materiales y Métodos.....	26
2. Diseño.....	26
2.1 Población y muestra.....	26
2.2 Veneno .....	27
2.3 Obtención de extractos .....	27
2.3.1 Extracto alcohólico: .....	27
2.3.2 Extracto acuoso.....	27
3. Estudio de actividad biológica.....	27
3.1 Actividad anti coagulante .....	27
3.2 Actividad anti proteolítica .....	28
3.3 Perfil electroforético .....	29
Capítulo III.....	37
Resultados y discusiones.....	37
3.1 Resultados .....	37
3.1.1 Actividad Anti coagulante .....	37
3.1.2 Actividad Anti proteólisis .....	43

3.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	46
Determinación del peso molecular de las proteínas.....	48
Discusión .....	53
Conclusiones .....	55
6. Lista de referencias .....	56



## Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunt) Griseb (Kurarina) .....	5
Tabla 2. Composición proximal de Kurarina en 100 g de materia seca .....	7
Tabla 3. Uso medicinal de la Kurarina.....	8
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav (Kunapi). .....	9
Tabla 5. Familias de Serpientes venenosas en el Ecuador .....	11
Tabla 6. Efecto del género <i>B. atrox</i> en el ser humano .....	12
Tabla 7. Dosis administrada según el cuadro clínico de un accidente ofídico.....	25
Tabla 8. Solución Tampón Tris-HCL 1,5 pH 8,8 .....	33
Tabla 9. Solución tampón Tris- HCl 0,5 M pH 6,8.....	33
Tabla 10. Solución SDS 10% .....	34
Tabla 11. Poliacrilamida 30% .....	34
Tabla 12. Componentes de 1 Minigel. ....	34
Tabla 13. Tampón muestra <sup>a</sup> .....	35
Tabla 14. Tampón de electroforesis 10X Tris Glicina pH 8,3 .....	35
Tabla 15. Tampón de electroforesis 1X Tris-Glicina pH 8,3.....	35
Tabla 16. Solución decolorante de geles <sup>a</sup> .....	36
Tabla 17. Azul de Commassie <sup>a</sup> .....	36
Tabla 18. Tiempo medio de Coagulación del plasma sanguíneo con extractos de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunt) Griseb (Kurarina) .....	37
Tabla 19. Tiempo medio de Coagulación del plasma sanguíneo con extractos de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi).....	38
Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) para el tiempo de coagulación .....	38

Tabla 21. Rangos de significancia para extractos alcohólico y acuoso de Kunapi y Kurarina.....	39
Tabla 22. Rangos de significancia para Kunapi y Kurarina.....	39
Tabla 23. Disminución de la actividad proteolítica del veneno de <i>B. atrox</i> por acción de Kurarina y Kunapi a 280 nm .....	43
Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) para determinar prueba anti proteolítica.	44
Tabla 25. Rangos de significancia para Kunapi y Kurarina.....	44
Tabla 26. Rangos de significancia para actividad anti proteolítica por especie.....	45
Tabla 27. Número de bandas en gel de Poliacrilamida (DSD-PAGE). .....	48
Tabla 28. Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de <i>B.atrox</i> .....	48
Tabla 29. Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de <i>B.atrox</i> tratado con el extracto acuoso del Kunapi.....	48
Tabla 30.. Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de <i>B. atrox</i> tratado con el extracto acuoso de Kurarina .....	50
Tabla 31. Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de <i>B.atrox</i> tratado con el extracto alcohólico de Kunapi .....	49
Tabla 32.. Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de <i>B.atrox</i> tratado con el extracto alcohólico de Kurarina .....	52

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina) .....	6
Figura 2. <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav (Kunapi) .....	9
Figura 3. <i>Bothrops atrox</i> (Pitalala) .....	13
Figura 4. Coagulación sanguínea .....	18
Figura 5. Acciones secundarias del efecto trombótico.....	19
Figura 6. Estructura de acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida.....	22
Figura 7. Actividad anti coagulante por especie y por extracto. ....	40
Figura 8. Actividad anti coagulante por extracto y por dilución.....	41
Figura 9. Actividad anti coagulante por especie y por dilución.....	42
Figura 10. Actividad proteolítica por especie y por extracto. ....	45
Figura 11. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes .....	46
Figura 12. Electroforesis vertical del extracto alcohólico de Kunapi y Kurarina.....	47

## Índice de Anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina). .....	64
Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi).....	65
Anexo 3. Extracto del permiso de investigación emitido por el Ministerio del Ambiente .....	66
Anexo 4. Extracción manual del veneno de serpiente de <i>B. atrox</i> .....	67
Anexo 5. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto alcohólico de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina) .....	68
Anexo 6. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto acuoso de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina).....	68
Anexo 7. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto acuso de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi). .....	69
Anexo 8. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto alcohólico de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi). .....	69
Anexo 9. Formación del coagulo sanguíneo en extracto acuoso de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi) .....	70
Anexo 10. Formación del coagulo sanguíneo en extracto acuso y alcohólico de <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina). .....	71
Anexo 11. Absorbancia a 280 nm en extracto acuoso y alcohólico de <i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi) y <i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina). .....	72
Anexo 12. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto acuoso de Kurarina.....	73

Anexo 13. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto alcohólico de Kurarina.....	73
Anexo 14. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto acuoso de Kunapi .....	73
Anexo 15. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto alcohólico de Kunapi .....	74
Anexo 16. Perfil electroforético del veneno de <i>B. atrox</i> con y sin tratamientos.....	74
Anexo 17. Determinación de Pesos Moleculares y Rf, obtenidos en la Electroforesis. ....	75

## Resumen

Ecuador cuenta con una flora y fauna mega diversa en sus cuatro regiones geográficas. En la amazonia ecuatoriana habita la serpiente *Bothrops atrox*, causante del mayor número de accidentes por mordeduras registradas; habitantes de ésta región aseguran que plantas como Kunapi (*Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav) y Kurarina (*Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb) son de uso común para contrarrestar mencionado efecto. En ésta investigación se determinó *in vitro* la actividad neutralizante de los extractos de estas especies vegetales sobre los efectos del veneno de *B. atrox*. Las muestras fueron colectadas en los cantones Morona y Huamboya de la provincia de Morona Santiago, a partir de las cuales, se elaboraron extractos totales secos, alcohólicos y acuosos para ensayar actividad anti coagulante y anti proteolítica, utilizando diferentes concentraciones de los extractos sobre una dosis definida del veneno; además se determinó el perfil electroforético, antes y después de la acción de los extractos. Los resultados obtenidos de actividad anti coagulante revelaron que una concentración de 0,25 ppm del extracto alcohólico de ambas especies vegetales es suficiente para neutralizar el efecto coagulante de una disolución de 0,02 mg/mL, de veneno aumentando el tiempo de coagulación del plasma en un 500%. Los resultados de actividad anti proteolítica evidenciaron que el extracto acuoso de *T. sananho* fue más eficaz y que *M. mollis* no tiene ésta actividad. El perfil electroforético determinó que los extractos alcohólicos de las dos especies cambiaron el perfil proteico por aparición de una banda para una proteína de 45,8 kDa.

**Palabras clave:** *Bothrops atrox*, *Tabernaemontana sananho*, *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb, actividad alexitéra.

## Abstract

Ecuador has abundant and diverse flora and fauna in its four geographic regions. In the Ecuadorian Amazon inhabits the snake *Bothrops atrox*, that caused the highest number of accidents by bites registered; inhabitants of this region ensure that plants such as Kunapi (*Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav) and Kurarina (*Minthostachys mollis* (kunth) Griseb) are commonly used to counteract said effect. In this investigation, it was determined *in vitro* the neutralizing activity of the extracts of these two-plant species on the effects of the venom of *B. atrox*. The Samples of these plants were collected in Huamboya and Morona, cantons of the province of Morona Santiago, from which, were prepared dry total extracts, alcoholic and aqueous to test the anti-coagulant activity and anti-proteolytic, using different concentrations of the extracts on a defined dose of the venom of *B. atrox*; in addition, the electrophoretic profile was determined, before and after the action of the extracts. The results obtained from anticoagulant activity revealed that a concentration of 0,25 ppm of the alcoholic extract of both species is sufficient to neutralize the coagulant effect of a dissolution 0.02 mg/ml, of poison by increasing the clotting time of the plasma by 500%. The results of anti-proteolytic activity evidenced that the aqueous extract of T. *Sananho* was more effective and that *M. mollis* does not have this activity. The electrophoretic profile determined that the alcoholic extracts of the two-species changed the protein profile by the appearance of a band for a protein of 45,8 kDa.

**Key words:** *Bothrops atrox*, *Tabernaemontana sananho*, *Minthostachys mollis*, Alexiteric activity.

## Introducción

Un accidente ofídico constituye un problema de salud pública en el Ecuador principalmente debido a una falta de tratamiento o atención pre hospitalaria oportuna, causada por el difícil acceso a las zonas rurales donde éstos ocurren. Los ataques de serpientes venenosas suceden principalmente entre los meses de mayo y agosto provocando heridas severas, invalidez de la persona afectada o incluso la muerte (OMS, 2008). Se estima que alrededor de todo el mundo ocurren 125.000 muertes por año a causa de envenenamiento por accidente ofídico, y en América del Sur la cifra es de 50.000 muertes/año (Córdoba & Santos, 2015).

A nivel nacional se han identificado un total de 200 especies de ofidios, de las cuales 44 son potencialmente venenosas y por tanto peligrosas para la salud humana (OMS, 2008), dependiendo del tamaño del animal, especie, edad, así como la localización anatómica de la mordedura y cantidad del veneno suministrado (Villamarín, 2009).

La población más vulnerable a un ataque por mordedura de *B. atrox* (conocida vulgarmente como “Pitalala”) es la que habita en la región amazónica siendo los agricultores, jornaleros, mineros y nativos de la zona las personas con mayor riesgo (OMS, 2008).

El tratamiento considerado para atender con éxito un accidente ofídico es la administración de suero antiofídico eficaz para inhibir los efectos sistémicos, no obstante, las plantas con propiedades alexíteras representan una alternativa para éste problema sanitario (Yerlequé, 2012), tal es el caso de las especies amazónicas *Kunapi* y *Kurarina* cuyo uso es habitual entre los habitantes de la etnia Shuar.



El objetivo general de la presente investigación fue evaluar la actividad alexitéra de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) sobre veneno de *Bothrops atrox* (Pitalala) a través de haber cumplido tres objetivos específicos: evaluar la actividad anti coagulante, la actividad anti proteolítica de los extractos totales secos de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) sobre el veneno de *Bothrops atrox* (Pitalala) y, determinar el perfil electroforético del veneno de *B. atrox*, antes y después del tratamiento con los extractos vegetales, utilizando la técnica SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Para ello se estableció la hipótesis nula (Ho) para comprobar que ninguna de las plantas estudiadas careció de actividad anti coagulante o actividad anti proteolítica, y, ninguna de las especies estudiadas mantuvo intacto el perfil electroforético del veneno de *Bothrops atrox* (Pitalala). Como hipótesis alternativa (Ha) se estableció que al menos una concentración de extracto total seco de las plantas estudiadas careció de actividad anti coagulante o actividad anti proteolítica, y, al menos un extracto de las especies estudiadas mantuvo intacto el perfil electroforético del veneno de *Bothrops atrox*.

## Capítulo I

### Marco Conceptual

#### 1.1 Antecedentes.

Se dice que una planta alexítera es aquella que tiene la propiedad de aliviar síntomas como dolor intenso, hemorragias incluso envenenamiento, causadas por mordedura de serpientes o animales ponzoñosos. (DICA, s.f.).

Barreto (2013) menciona que el conocimiento ancestral de plantas alexíteras es muy antiguo; desde siglos anteriores al cristianismo en la medicina ayurvédica, se conocían alrededor de 211 plantas con ésta propiedad; en México de la época prehispánica se utilizaban al menos 19 plantas, y entre ellas al tabaco (*N. tabacum*).

En Colombia se describe el uso de más de 77 plantas, solas o combinadas, en extracto acuoso, alcohólicos y emplastos, de las plantas solas o combinadas (Torres A. , 2014)

En Ecuador, diversas etnias a lo largo y ancho de su territorio, poseen un vasto conocimiento sobre el tratamiento del accidente ofídico; por citar algunas, las etnias Tsáchila, Cayapa y Coaquier utilizan principalmente especies de Gesneriaceas (Kvist, 1986), Polypodiales y Piperaceas (Holm-Nielsen, Kvist, & Aguavil, 1983) en diferentes preparaciones principalmente contra la mordedura de *Bothrops atrox* y otras especies de ofidios.

Mors (1991) realizó la primera revisión exhaustiva sobre las plantas con propiedades alexíteras alrededor de todo el mundo; sin embargo, no todas las especies que el autor investigó fueron publicadas, concluyendo que a lo largo de la historia se han conocido al menos 578 especies vegetales alexíteras, pertenecientes a 94 familias, de las cuales se destacan 15. Entre las dicotiledóneas alexíteras más importantes se encuentran las familias: Asteraceae, Leguminosae, Euphorbiaceae, Apocynaceae, Rubiaceae y Lamiaceae; entre las monocotiledóneas predominan las Araceae y Zingiberaceae.

Con partes de las especies de estas familias o con las plantas completas se elaboran macerados, infusiones, zumos, decoctos o emplastos que se ingieren o se aplican en el área afectada, según sea la necesidad, con el objetivo de neutralizar los efectos del veneno del animal o calmar los síntomas a través de estimular el sistema inmune o desencadenar respuestas antiinflamatorias (López & Pérez, 2009).

## **1.2 Química de las plantas alexíteras**

Las plantas alexíteras tienen la propiedad de aliviar varios síntomas como son dolor agudo o grave, sangrado o infección causado por envenenamiento (Sumpa & Pakunt, 2013).

Ellas se caracterizan por presentar tres grupos importantes de metabolitos secundarios los cuales neutralizan los efectos provocados por un accidente ofídico. El primer grupo son los polifenoles tales como isoflavonoides presentes en las raíces de las leguminosas; a ese grupo se le atribuye la propiedad de inhibir la acción miotóxica y edemática; también están los taninos los cuales poseen la capacidad detoxificante ya que forman complejos con la proteína del veneno. El segundo grupo figuran los alcaloides los cuales reportan actividad antiinflamatoria e inhiben la actividad lítica por lo cual se reduce el edema provocado por las lipasas que se encuentran presentes en el veneno. El tercer grupo pertenece a los triterpenoides y esteroides, mismos que son encargados de inhibir las actividades proteolíticas y detener la hemorragia (Torres & otros, 2015).

## **1.3. Especies vegetales estudiadas**

Muestras de las especies vegetales estudiadas se colectaron tras haber obtenido información oral de habitantes de la etnia Shuar que habita los cantones Morona y Huamboya en la provincia de Morona Santiago.

### 1.3.1 *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)

#### 1.3.1.1 Generalidades

Es un arbusto pequeño con propiedades aromáticas, habita en pendientes rocosas desde los 2,600 hasta los 3,800 (msnm). Éste arbusto se extiende desde Colombia, pasa por Ecuador, Brasil, Perú y Bolivia hasta llega al centro de Argentina. Para que crezca y se desarrolle la Kurarina necesita un clima con abundantes lluvias y una alta luminosidad. Fue descrita en su totalidad por Epling en 1936 quien afirmó que existen 12 especies de éste género y enfatizó su dificultad para delimitarlas y describir a las mismas (Yapuchura, 2010).

#### 1.3.1.2 Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Éste arbusto es denominado “Muña” en lengua quechua, “Coa” y “Huaycha” en lengua aimara, y “Kurarina” en lengua shuar ya que ésta planta se asemeja al orégano y al poleo (Cano, 2007).

La Tabla 1 describe la clasificación taxonómica de ésta especie identificada por el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), como se indica en el (Anexo 1).

Tabla 1.

Taxonomía de *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)

TAXONOMÍA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Orden:	Lamiales Martinov
Familia:	Lamiaceae Martinov
Género:	Minthostachys (Benth.) Spach
Especie:	<i>Mollis (Kunth) Griseb.</i>

Nota: Realizado por el autor (2017)

Fuente: (Muñoz & Tapia, 2017)

### 1.3.1.3 Descripción botánica

La especie *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb conocida vulgarmente como “Kurarina” es un arbusto de aproximadamente 0.9 a 1.5 m de altura, bastante frondosa en su parte superior, presenta un aspecto tupido en hojas. Sus hojas son opuestas y aserradas, tiene pelos en el pecíolo y en la cara posterior de las hojas, lugar en donde presenta el mayor porcentaje de aceite esencial. La Kurarina tiene un tallo ramificado desde la base, donde están presentes unos pelos, sus flores son pequeñas, zigomorfas y presentan un color blanco; estas flores se encuentran reunidas en verticilos axilares, aparentando una forma de pequeñas cimas que van de cuatro en cuatro, situadas en la parte superior de las ramas (Muñoz & Tapia, 2017).

En cuanto a su fruto es formado por cuatro aquenios de color marrón. La floración de ésta planta ocurre una vez al año, y es importante que la cosecha de éste fruto se lo haga cuando esté en período de prefloración (Elechosa & Mercedes, 2009). La Kurarina se muestra en la Figura 1.



Figura 1. *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)  
Fuente: El autor (2017)

#### 1.3.1.4 Composición proximal

La Kurarina tiene un alto contenido de calcio y fósforo; en la tabla 2 se presenta un resumen de su composición proximal.

Tabla 2.

Composición proximal de Kurarina en 100 g de materia seca

Componentes	Cantidad (g)
Agua	16.0
Proteína	3.2
Grasa	2.8
Carbohidratos	66.3
Fibra	9.4
Ceniza	11.7
Calcio	2.2
Fósforo	0.2
Hierro	0.02
Retinol	0.3
Tiamina	0.00035
Riboflavina	0.00181
Niacina	0.00850

Nota: Realizado por el autor (2017)

Fuente: (Yapuchura, 2010)

#### 1.3.1.5 Uso etnobotánico

La Kurarina desde hace tiempo es reconocida por sus propiedades medicinales y comestibles, también se utiliza para proteger a los tubérculos de sus plagas durante su almacenamiento. Sus hojas se emplean como preventivas de tumores, así mismo se utilizan con la clara de huevo en fracturas de huesos, también como anti inflamatorio y anti reumático, en mezclas con miel de abeja limpia la flema en el pecho (expectorante), y laceraciones en pulmón, riñones y vejiga. Se emplea en infusión para aliviar cólicos de gases, diarreas, tiene acción carminativa, para curar heridas, úlceras, sarnas, picazón, pie de atleta, cólicos menstruales, picazón de úlceras (Cano, 2007) y (López J. , 2017).

Otro uso importante es su capacidad alexítera ya que es capaz de neutralizar al veneno del ataque proveniente de una serpiente; para lo cual se aplica directamente una infusión de las hojas sobre la herida (Jara, Lozada, & Peñaranda, 2014). Los usos etnobotánicos se resumen en la tabla 3.

Tabla 3.  
Uso medicinal de la Kurarina

<b>Dolor/ Malestar/ Herida</b>	<b>Parte de planta a utilizarse</b>	<b>Modo de aplicación</b>
Dolor de estomago	Hoja	Mate
Diarrea	Hoja	Mate
Resfrío	Hoja	Baño con agua de la sección de la planta
Inflamación	Hoja	Lavarse con el agua de ésta sección
Indigestión	Hoja	Mate
Dolor de dientes	Hoja	Masticar con los dientes
Enterocolitis	Hoja	Mate
Mordedura de serpiente	Hoja	Infusión

Nota: realizado por el autor (2017)

Fuente: (Yapuchura, 2010)

### **1.3.2 *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav (Kunapi)**

#### **1.3.2.1 Generalidades**

Ésta especie conocida en lengua Shuar como Kunapi es un arbusto silvestre o un árbol que mide aproximadamente 7 a 8 metros, habita en América del Sur, Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana., crece en elevaciones de 630 msnm (Useful tropical plants, 2017) y (GDA Huamboya, 2017).

#### **1.3.2.2 Descripción botánica**

Presenta un tallo delgado sin ramificaciones; sus flores son blancas abiertas con una tonalidad amarillenta en el centro de la misma; tienen un tubo de néctar profundo cubierto por 5 sépalos a su alrededor en forma de cinta; son muy fragantes de olor

penetrante; sus hojas son grandes y atractivas a la vista pueden medir de 15 a 25 cm de largo, por 8 a 13 cm de ancho (Omenexus, 2016). El Kunapi se muestra en la figura

2



Figura 2. *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav (Kunapi)  
Fuente: El autor, (2017)

### 1.3.2.3 Clasificación taxonómica y descripción morfológica

La identificación de las muestras colectadas se realizó en el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 2); la tabla 4 describe la clasificación taxonómica de ésta especie.

Tabla 4.

Clasificación taxonómica de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav (Kunapi).

TAXONOMIA	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Equisetopsida C. Agargh
<b>Orden:</b>	Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
<b>Familia:</b>	Apocynaceae Juss.
<b>Género:</b>	Tabernaemontana L.
<b>Especie:</b>	<i>Sananho Ruiz &amp; Pav</i>

Nota: Realizado por el autor (2017)

Fuente: (Cueva J. , 2017)



#### **1.3.2.4 Uso Etnobotánico**

En el ambiente nativo amazónico el Kunapi es usado medicinalmente por varias comunidades, y se considera como una planta maestra; las hojas se usan con la ayahuasca en infusiones para rituales sagrados, también se usa como ingrediente en venenos de flecha (Omenexus, 2016), sus hojas además son utilizadas como emético, diurético y calmante.

### **1.4 Serpientes**

#### **1.4.1 Generalidades**

Las serpientes son ofidios, que pertenecen al orden Squamata, se caracterizan por no presentar patas y por poseer un cuerpo muy alargado provisto de fosetas dependiendo de la especie; respiran a través de sus pulmones, mudan de piel varias veces al año siendo ésta, una de sus características particulares (Valls, 2016). Son animales nocturnos por lo que los accidentes por mordeduras ocurren en la noche. Los ofidios al inocular su veneno pueden causar un sin número de manifestaciones clínicas y patológicas en sus víctimas ya que está constituido por proteínas y polipéptidos con efecto tóxico y enzimático. Se clasifican en cinco familias: Columbridae, Elapidae, Hidropidae, Viperidae y Crotalidae (Cueva, Chanfuél, & Erazo, 2010).

#### **1.5 Serpientes en el Ecuador**

Al poseer Ecuador un 70 % de zonas geográficas tropicales y subtropicales, permite el crecimiento de ofidios venenosos. Según el Ministerio de Salud Pública de Ecuador (MSP, 2008), se han identificado 200 especies de serpientes de las cuales 44 son potencialmente venenosas y peligrosas para los habitantes de esas zonas, por lo que es frecuente el accidente por mordedura de ofidios ocurra en altitudes menores a los 2500 m.s.n.m. En la tabla 5 se presentan las serpientes venenosas del Ecuador.

Tabla 5.  
Familias de Serpientes venenosas en el Ecuador

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Nombre común</b>
Elapidae	Micrurus Leptomicrus	Coral
Viperidae-Crotalinae	Bothrops Bothrocophias Bothriopsis Bothriechis Porthidium Lachesis	Equis, pitalala Boquisapo Lorito machacui, shinshin Cordoncillo, papagayo, sol Sapo machacui Verrugosa, huascama
Hidropidae	Pelamis	Culebra marina

Nota: elaborado por el autor, (2017)

Fuente: (Cueva, Chanfuél, & Erazo, 2010)

### 1.6 Género Bothrops

Éste género se encuentra distribuido en Centro y Sur América y el sur de América del Norte; entre las especies más importantes están: *B. jaraca*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. asper*, *B. erythromelas*, *B. moojeni* (Fernández T. , 2017). Se distinguen por presentar cabeza ancha y plana, teniendo ausencia de orificio auditivo y de párpados móviles, presenta una lengua bífida, el tamaño de estas criaturas puede ir desde los 50-70 cm y llegar a los 200 cm de longitud en el caso de los ejemplares adultos, tienen colmillos largos y tubulares en la parte anterior, en cuanto a sus órganos internos solo presenta un pulmón derecho, riñones largos y el órgano copulador del macho se encuentra ubicado en la cola, son dioicos sexuales pudiendo llegar a parir entre 8 a 43 crías (Villacreses, 2013).

Éste género es uno de los más venenosos del Ecuador ya que al inocular su veneno hace que la víctima presente manifestaciones hemorrágicas, insuficiencia renal, necrosis hasta llegar a la amputación del miembro afectado; esto se debe a que el veneno posee actividad proteolítica, coagulante, citotóxica y necrotizante (Campbell,

Lamar, & Brodie, 2011). En la tabla 6 se presenta los principales efectos de la mordedura de serpiente sobre el humano.

Tabla 6.  
Efecto del género *B. atrox* en el ser humano

<b>Género</b>	<b>CDV</b>	<b>ADV</b>	<b>LAV</b>	<b>EDV</b>	<b>DML</b>
Bothrops	Miotoxina Mionecrotizante Cardiotoxina	Inhibición de la segregación plaquetas. Afecta la integridad de las membranas plasmáticas de los miocitos	Plaquetas y Miocitos	Alteración de la coagulación. Necrosis de tejido. Hemorragias graves o letales. Insuficiencia renal.	60 mg
<b>CDV=</b> (Clase de veneno), <b>ADV=</b> (Acción del veneno), <b>LAV=</b> (Lugar de acción del veneno), <b>EDV=</b> (Efectos del veneno), <b>DML=</b> (Dosis mínima letal),					

Nota: Elaborado por el autor (2017)

Fuente: (MSP, 2008)

## 1.7 *Bothrops atrox*

### 1.7.1 Generalidades

“Atrox” proviene del latín que significa salvaje, feroz y hace referencia a la agresividad del ofidio al encontrarse en una situación irritable (PUCE, 2014). Comúnmente conocida como Pitalala, Mapaná, Mapanare, Barba amarilla, Pudridora, puede llegar a medir 240 cm de longitud total; el color de su cuerpo es variable puede presentar un color gris oscuro parduzco, pardo rojizo en la de la cabeza con bandas transversales oscuras o negras, o un color verde oliva, café grisáceo, o hasta amarillento; su cabeza presenta una banda detrás del ojo negra que se extiende hasta la parte posterior de la boca. Es ovovivípara y habita principalmente en zonas boscosas y rocosas donde predomine la humedad (Fernández T. , 2017); se alimenta de ranas,

lagartijas, otras serpientes más pequeñas, aves y también de mamíferos. En el Ecuador el período de gestación fluctúa de 3 a 4 meses, ésta especie puede tener hasta 80 crías por camada, estas crías ya están provistas de glándulas venenosas; entre más joven es la serpiente puede llegar a ser incluso más venenosa. la *B. atrox* es terrestre, pero se la puede encontrar en palmas hasta los 3 metros de altura (Serpentario Nacional de Colombia, 2017),. (Figura 3).

### 1.7.2 Hábitat y distribución

En el Ecuador habita en zonas tropicales orientales, se ha observado principalmente en provincias de Sucumbíos, Pastaza, Orellana, Napo, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Está distribuida principalmente en ambientes húmedos como bosques, bajos, sabanas, bosques tropicales y lluviosos. Generalmente se la encuentra habitando arroyos, lagos o ríos, sin embargo, también habita cultivos campos húmedos, o en áreas donde existe asentamiento humano. Así se han identificado especímenes jóvenes en arbustos generalmente que llegan hasta los 1,5 m., mientras que los especímenes adultos habitan el suelo y en ocasiones se los ha visto rondar los cultivos (PUCE, 2014).



Figura 3. *Bothrops atrox* (Pitalala)  
Fuente: (Pazmiño & Otamendi, 2014)

## 1.8 Accidente bothrópico

### 1.8.1 Generalidades

La mordedura de ofidios de especies del género *Bothrops* se conoce como accidente bothrópico, el cual es peligroso puesto que inyecta en el sistema circulatorio de la víctima su veneno que provoca dolores agudos, grandes inflamaciones locales, hemorragias graves que pueden llegar a la necrosis del tejido afectado, en algunos casos puede provocar problemas agudos en riñones, incluso fallos en el sistema cardiovascular (Pereañez & Jimenez, 2008) y (Gonzales & Díaz, 2013).

Según el Ministerio de Salud (MSP, 2008) el veneno de serpiente es una de las sustancias que presenta el mayor número de componentes tóxicos de los cuales se han identificado las siguientes sustancias bioquímicas como son:

- **Coagulantes sanguíneos** que afectan específicamente la membrana celular de los eritrocitos responsables de activar factores de coagulación que desencadenan reacciones hemorrágicas.
- Proteínas como las **citolisinas y proteolisinas** que afectan los endotelios vasculares por que causan un edema al aumentar la permeabilidad vascular.
- Una enzima **antibactericida** que evita que los leucocitos realicen su actividad de fagocitar agentes extraños por lo que provoca un proceso infeccioso.
- **Neurotoxinas A y B**, y **colinesterasas** que afectan al sistema cardiovascular, provocando parálisis a los músculos cardíacos.
- **Miotoxinas y cardiotoxinas** que pueden provocar un shock al despolarizar fibras esqueléticas de los miocitos.
- **Hialuronidasa** el cual permite la fácil y rápida propagación del veneno

- Enzimas proteolíticas: **colagenasa** y **elastasa** las cuales separan el tejido conectivo y contribuyen a la necrotización del tejido.
- Por último, se encuentran enzimas que contribuyen al proceso hemolítico:

**Fosfolipasa y fosfodiesterasa.**

Las propiedades biológicas de dichos compuestos varían entre género, especie y edad de cada espécimen; el género *Bothrops* cuenta con numerosas enzimas mionecrotizantes mismas que pueden producir lesión en los vasos linfáticos, fibrinólisis incluso coagulación intravascular diseminada (MSP, 2008).

### **1.8.2 Cuadro clínico**

Según (Maldonado A. , 2016) el veneno de serpiente produce efectos que pueden presentarse de manera local o sistémica de acuerdo con la gravedad del accidente y la cantidad de veneno inoculado; el cuadro clínico del accidente bothrópico en un paciente puede clasificarse de la siguiente manera:

- **Asintomático:** Al realizar las pruebas respectivas de coagulación no se presenta evidencia de un cuadro clínico ni manifestaciones patológicas (Pérez, 2013).
- **Envenenamiento leve:** Dolor ligeramente leve o ausente, no existe presencia de hemorragia luego de transcurridas dos horas. El paciente no necesita tratamiento ya que tiene una coagulación normal, pero debe ser observado dentro de 24 horas luego de sucedido el accidente para monitoreo tiempo de coagulación (Quesada & Aguilera, 2012).
- **Envenenamiento moderado:** El dolor es intenso en la zona local afectada, existe presencia de edema duro y moderado acompañado de temperatura y la

presencia de rubor, equimosis, hematomas, puede o no haber flictenas y ausencia de necrosis. No existe hemorragia, sin embargo, el tiempo de coagulación es prologando (más de 20 minutos). El paciente debe ser atendido con suero antiofídico y debe someterse a pruebas de coagulación cada 6 horas (Pérez, 2013).

- **Envenenamiento severo:** Presencia de dolor agudo e intenso en zona local afectada, edema progresivo, existe flictenas, se observa necrosis superficial y profunda, también hay presencia de ampollas. El tiempo de coagulación aumenta por más de 20 minutos; el paciente presenta un cuadro clínico de hemorragia, cefaleas, náuseas, gingivorragia, epistaxis, trastorno circulatorio y hematuria dentro de las 24 horas. El paciente debe ser atendido con suero antiofídico, para que con esto se disminuya el riesgo de necrosis, debe ser monitoreado el tiempo de coagulación cada 6 horas (Maldonado A. , 2016).

Dependiendo de la severidad del accidente, se pueden observar alteraciones de la homeostasia celular, y de la coagulación sanguínea como son los efectos hemolíticos, coagulantes y proteolíticos en los tejidos de las víctimas, los cuales se describen a continuación:

### **1.9 Alteración de los mecanismos de la Homeostasia y Coagulación sanguínea.**

El veneno de *B. atrox* provoca daño a nivel celular y alteración en algunos mecanismos fisiológicos que regulan la homeostasia. Se destacan principalmente la hemólisis, alteración de la coagulación sanguínea sistémica y proteólisis como algunos de los efectos de relevancia que son objeto de ensayo *in vitro* para establecer la actividad alexítera de especies vegetales.

### 1.9.1 Hemólisis

La hemolisis es la ruptura de la membrana celular de los eritrocitos que produce la liberación de hemoglobina en el plasma sanguíneo provocando alteraciones en su composición (Castro, 2016).

Existen dos tipos de hemolisis *in vivo* las cuales son:

- **Extravascular:** éste proceso ocurre en partes especializadas donde los eritrocitos son regenerados, puede ser el bazo, hígado o médula ósea (Fernández G. , 2013).
- **Intravascular:** éste fenómeno ocurre solamente en el sistema vascular por que la hemoglobina es liberada directamente en el torrente sanguíneo, por lo que pueden aparecer enfermedades y el sistema es incapaz de regenerar los eritrocitos (Fernández G. , 2013).

(Torres, Álvares, & Artigas, 2002) mencionan que cuando ocurre un accidente ofídico la actividad hemolítica puede responder a dos mecanismos los cuales son:

- **Hemolisis directa de los eritrocitos:** En donde no se puede constatar el cuadro clínico debido a algunos componentes del veneno.
- **Hemolisis indirecta de los eritrocitos:** En éste proceso el veneno trasforma la lectina en isolectina por acción de fosfolipasa A<sub>2</sub>.

En los dos mecanismos los eritrocitos se ven afectados ya que aumenta su tamaño en volumen, tienden a adoptar una forma esférica y con el paso del tiempo disminuye de manera significativa su resistencia hasta ser destruidos. Al cabo de una hora estos mecanismos pueden provocar metahemoglobina, anuria, hematuria; finalmente puede terminar en la muerte por intoxicación endógena por deficiencia renal ya que la



miohemoglobina obstruye totalmente los túbulos renales (Torres, Álvares, & Artigas, 2002).

### 1.9.2 Coagulación sanguínea

Al ocurrir una lesión en un vaso sanguíneo, las paredes tienden a contraerse para limitar el flujo sanguíneo, seguidamente las plaquetas se aglutinan en el sitio de la lesión y se distribuyen a lo largo del vaso sanguíneo, estas células se encargan de liberar señales químicas con el objetivo de atraer otras células; éstas se agrupan para formar el tapón plaquetario; al estar activas estas plaquetas trabajan muchos factores de coagulación para dar origen a una cascada de reacciones para formar un coágulo de fibrina, mismo que detiene el sangrado (FMH, 2014). (Figura 4)

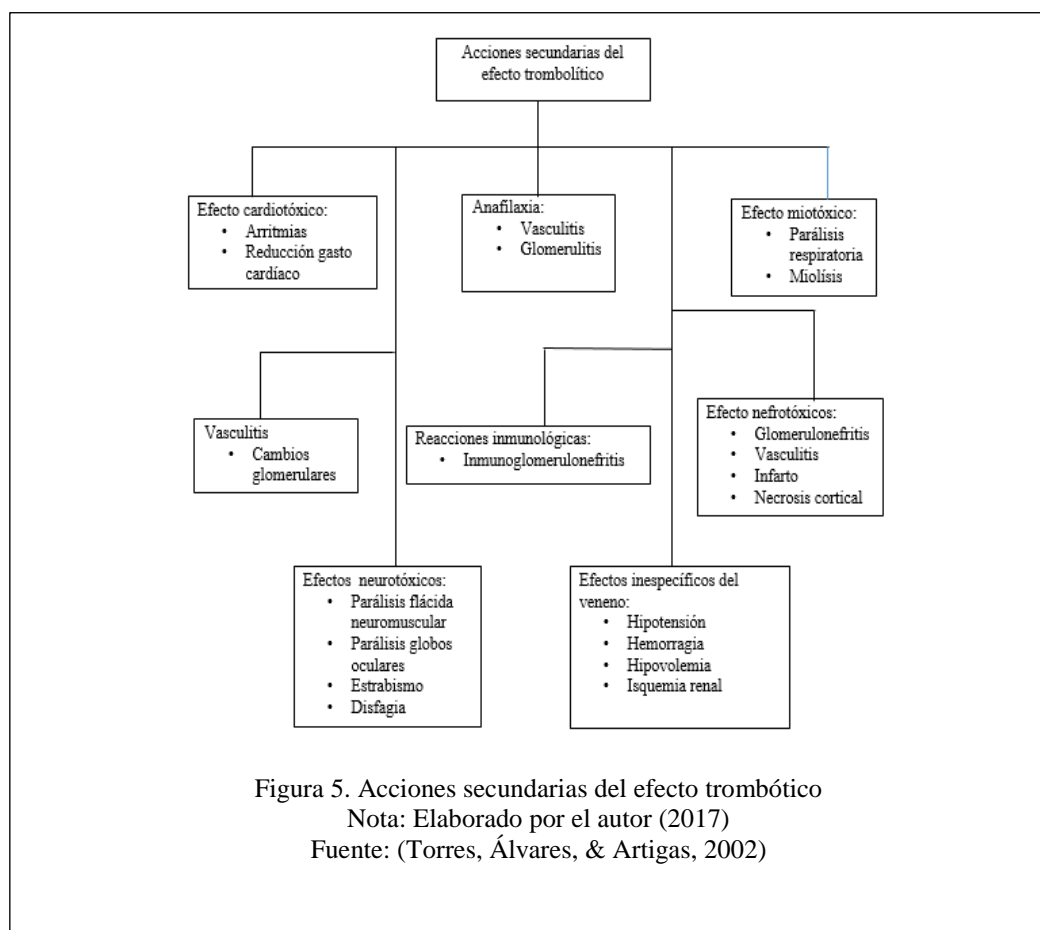


Figura 4. Coagulación sanguínea  
Fuente: (FMH, 2014)

El veneno en contacto con la sangre provoca un efecto trombolítico activando factores de coagulación como son: X, V, protrombina y fibrinógeno; que pueden dañar el endotelio vascular. En primera instancia comienza con una coagulación diseminada siguiendo con hemorragias generalizadas presentes en la orina, sistema respiratorio, digestivo o en la piel (Torres, Álvares, & Artigas, 2002).

Una dosis mínima ( $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) de veneno en la sangre forma micro coágulos por acción del fibrinógeno a nivel de los capilares pulmonares, permaneciendo así la sangre incoagulable sin producir hemorragia. A pesar de esto, el tiempo de coagulación es normal (Torres, Álvares, & Artigas, 2002).

Por el contrario si existe una inoculación superior de veneno a ( $0.4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) provoca la muerte del paciente ya que ocurre una coagulación intravascular total, provocando actividad fibrinolítica debido a los efectos secundarios que éste provoca (Torres, Álvares, & Artigas, 2002). (Figura 5).



### **1.9.3 Proteólisis**

Es la degradación o fragmentación completa de proteínas en aminoácidos mediante enzimas específicas llamadas peptidasas o hidrolasas que actúan a nivel del enlace peptídico.

Al ser mordido por una serpiente, el veneno que es inoculado en el interior de la víctima comienza a actuar en el exterior de la herida provocando efectos citotóxicos como muerte celular, efectos hemotóxicos, miotóxicos, y hemorrágicos (Alarcón & Baldeón, s.f.).

### **1.10. Perfil electroforético del veneno de *B. atrox***

Existe una fuerte correlación entre la actividad alexítera *in vitro* determinada a través de los ensayos de inhibición de coagulación y proteólisis del veneno de especies del género *Bothrops* por acción de extractos vegetales y, las variaciones del perfil proteico del mismo, detectadas por SDS PAGE (Camargo & otros, 2011). Tomando en cuenta el perfil electroforético, se consideran como alexíteras aquellas plantas cuyos extractos modifican el patrón del veneno en el gel, atenuando, desapareciendo o, generando nuevas bandas de distinto peso molecular (Torres & otros, 2015).

#### **1.10.1 Electroforesis en gel**

El término electroforesis se refiere al movimiento de moléculas cargadas en respuesta a un campo eléctrico, resultando en su separación; las proteínas se mueven en dirección al electrodo de carga opuesta (BIO-RAD, s.f.). Implica la migración de biomoléculas sobre un soporte en función de la estructura, tamaño y densidad eléctrica de la biomolécula, del tamaño del poro del gel y del pH del medio (Carrillo, 2013).

Una partícula iónica, puede migrar a cierta velocidad ( $v$ ), dependiendo de la magnitud de su carga eléctrica ( $q$ ), el gradiente eléctrico aplicado ( $E$ ) y el coeficiente de fricción

(f) que depende de la naturaleza de cada sustancia en relación con la resistencia que le ofrece el medio para migrar, de acuerdo con la ecuación:

$$V = \frac{qE}{f}$$

Tomado de: (García, 2000).

Esto significa que la velocidad electroforética dependerá de la relación carga/peso de la molécula, del voltaje de la corriente eléctrica aplicada y del tamaño del poro del gel electroforético empleado. Cabe destacar la influencia que tiene el pH sobre la carga de las moléculas en el sistema, lo que también influye en la velocidad de migración de las moléculas iónicas (García, 2000).

### **1.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE)**

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos (Lomonte B. , 2007).

Laemmli (1970) realizó modificaciones al método propuesto por Tiselius (1937) y Raymond-Weintraub (1959) incorporando al gel de poliacrilamida, el dodecil-sulfato de sodio (SDS), como agente desnaturalizante, aumentando con ello el poder de resolución electroforético; posteriormente se incorporó agentes reductores y técnicas de tinción adecuadas para visualizar las moléculas separadas en bandas con lo que se consiguió determinar el peso molecular de las proteínas estableciéndose así la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Carrillo, 2013).

La técnica de Laemmli, o también conocida como Glicina-SDS-PAGE (en la que Tris-Glicina se usa como tampón electroforético) es comúnmente usada para separar proteínas cuyo peso se ubica en el rango de 1-500 kDa. Los geles de poliacrilamida corresponden al producto de co-polimerización vinílica entre acrilamida (AA) y N-metilen-bis-acrilamida (BAA). La reacción se inicia con la formación de radicales libres a partir de AA, por acción de persulfato de amonio (agente oxidante) y una amina terciaria como N-N-N'-tetrametilen-diamina (TEMED) que actúa como propagador en medio básico; ajustando la concentración de ambos compuestos se puede regular la velocidad de polimerización (García, 2000), (figura 6).

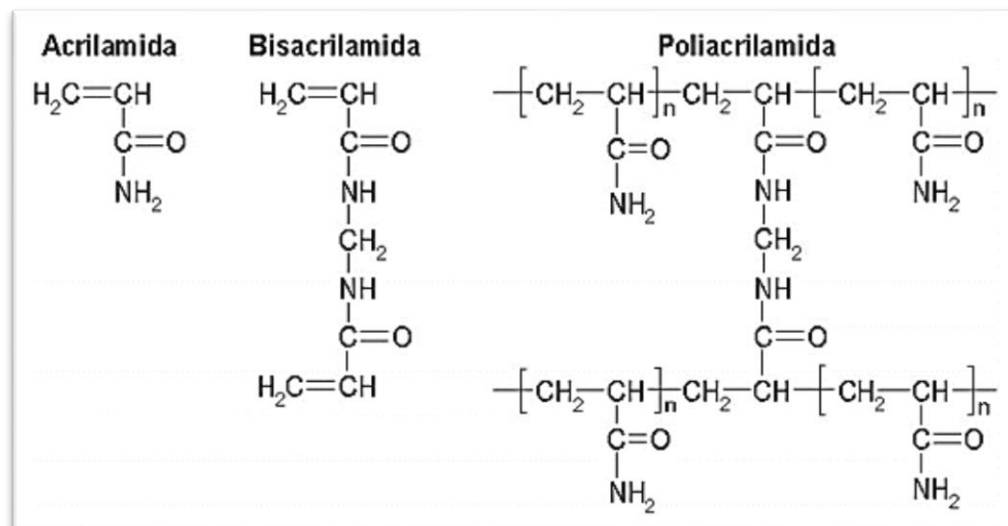


Figura 6. Estructura de acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida  
Fuente: Cultek, 2006

Usualmente los monómeros acrilamida y bis acrilamida son caracterizados como porcentaje total de concentración de monómeros (% T) y como porcentaje de dureza (%C) relativo a la concentración total, respectivamente (Schägger, 2006). El tamaño del poro del gel de poliacrilamida se establece por la concentración total de monómeros; así, el reticulado (% T) es la concentración total de monómeros ( $g_{(AA+BAA)}$ )

/100 mL) y, la dureza (% C), establece la concentración de BAA al total de monómeros en el gel y determina el grado de entrecruzamiento. Para que el gel tome una estructura adecuada, se debe tener en cuenta el porcentaje total de monómeros (% T) y la dureza (% C). Así, con 4 %T, y de 0,25 a 5 de % C, el tamaño del poro está gobernado por el % T; si éste último parámetro aumenta, disminuye el tamaño del poro. Ambos determinan las propiedades físicas del gel como densidad y resistencia mecánica. Al momento de aplicar muestras biológicas, las moléculas comienzan a migrar en un bajo porcentaje, y a medida que avanza la migración las biomoléculas se encuentran con poros incluso más pequeños por lo que se retarda su movimiento (Cultek, 2006)

### **1.10.3 Sistemas de tampón**

La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE emplea dos tampones. En general, el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, acumulándose en el pocillo de siembra; la separación se inicia cuando el frente de migración alcanza al segundo tampón (Lomonte B. , 2007).

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico (pI) y por ello se desplazan cuando se acciona sobre ellas un campo eléctrico. El potencial electrocinético está determinado por la fuerza iónica ( $m$ ) que reduce la carga neta de las especies cargadas. El desplazamiento de las moléculas iónicas está en relación inversa a la raíz cuadrada de  $m$ , por ello, la velocidad de migración aumenta cuando disminuye  $m$ , mejorando la resolución. Éste proceso de movilidad molecular por acción de un campo eléctrico y, por ende, la calidad de la separación puede verse afectada por factores tales como hidratación, no-homogeneidad o intercambio iónico con el soporte y

electroendósmosis producida en buffers neutros o ácidos. La electroforesis en geles de poliacrilamida se realiza en un rango de pH de 2 a 11 pero, la desaminación o la hidrólisis de proteínas puede ocurrir a pH inferiores a 3 y superiores a 10. Las proteínas cuyo pI está comprendido entre 4 y 7,5 se separan bien en geles con un pH entre 8 y 9. El SDS se une a cada dos residuos de aminoácidos (1,4 g/g) por absorción no específica, de ésta manera desnatura la proteína y rompe los enlaces no covalentes de las estructuras terciarias y cuaternarias. Al interior se colocan los grupos dodecil mientras que en la superficie los grupos sulfato; así, el complejo SDS-proteína toma una carga negativa. El frente de referencia (Rf) es un estimado de la movilidad relativa de la proteína frente a la migración total, y se establece como la distancia desde el comienzo del gel separador hasta el centro de la banda dividida entre la distancia que migró la banda patrón. El  $\beta$ -mercaptoetanol es un agente reductor de puentes bisulfuro que desnatura proteínas y las fracciona en subunidades más pequeñas. El complejo SDS-proteína al estar en contacto 5 minutos a 100 °C es suficiente para la formación de enlaces estables en presencia del EDTA; la migración de ésta es inversamente proporcional al logaritmo de su peso (García, 2000).

### **1.11 Tratamiento antiofídico**

Para el caso de mordedura de serpiente del género *Bothrops* de debe usar suero antiofídico mismo que está compuesto por una mezcla de inmunoglobulinas que frenan la absorción del veneno en la sangre (Quesada & Aguilera, 2012). Se recomienda utilizar el suero dentro de las 6 próximas horas tras haber ocurrido el accidente ofídico. A continuación, en la tabla 7, se presenta la dosis que debe ser administrada al paciente que sufrió de una mordedura de serpiente de acuerdo con el grado de severidad.

Tabla 7.

Dosis administrada según el cuadro clínico de un accidente ofídico

<b>Cuadro clínico</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Número de ampollas (Dosis)</b>	<b>Tiempo máximo de administración</b>
Envenenamiento asintomático	-	No se debe administrar suero antiofídico	-
Envenenamiento leve	Intravenosa	5 ampollas de suero antiofídico que debe ser diluido en 0.3 L de solución fisiológica al 0.9 %	3 Horas
Envenenamiento moderado	Intravenosa	10 ampollas de suero antiofídico que debe ser diluido en 0.3 L de solución fisiológica al 0.9 %,	3 horas
Envenenamiento severo	Intravenosa	15 ampollas de suero antiofídico que debe ser diluido en 0.3 L de solución fisiológica al 0.9 %,	3 horas

Nota: Elaborado por el autor, (2017)

Fuente: (Pérez, 2013)



## Capítulo II

### Materiales y Métodos

#### 2. Diseño

El presente trabajo se desarrolló de manera cuantitativa y cualitativa conforme a los objetivos planteados para determinar la actividad alexítera de las especies amazónicas *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina).

#### 2.1 Población y muestra

Se obtuvo el permiso de investigación otorgado por el Ministerio de Ambiente para proceder con la recolección de muestras de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina) en el bosque primario de los cantones Morona (parroquia Sevilla Don Bosco) y Huamboya (parroquia Chiguaza) de la provincia de Morona Santiago en una cantidad aproximada de 500 gramos de las partes aéreas (hojas y tallos); y cuando fue posible de las plantas completas; se tomaron además muestras para montaje e identificación en el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Las muestras para análisis fueron secadas por venteo en condiciones naturales protegidas del sol por un lapso de 15 días; posteriormente se trituraron para obtener un tamaño de partícula no superior a 5 mm de diámetro a fin de conseguir un adecuado proceso de extracción con solventes de polaridad creciente (Sadzawka & Carrasco, 2007).

## **2.2 Veneno**

Se utilizó veneno obtenido por ordeño manual de un ejemplar adulto de *B. atrox* en el cantón Sucúa, provincia de Morona Santiago, Ecuador. Se lo estabilizó con suero fisiológico en proporción 1:2 con solución salina ( $\rho_r=0.9384$ ) y se lo almacenó en tubos Eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Lomonte & Gutierrez, 1983). (Anexo 4).

## **2.3 Obtención de extractos**

Las especies vegetales fueron desinfectadas con hipoclorito al 10 % por 5 minutos, a continuación, se realizaron dos tipos de extractos vegetales (alcohólico, acuoso), utilizando la técnica de maceración, como se describe a continuación:

### **2.3.1 Extracto alcohólico:**

Se maceró 25 g de materia vegetal seca con 150 mL de alcohol absoluto durante 48 horas, se filtró y se concentró a sequedad en rota vapor (Reyes, 2016).

### **2.3.2 Extracto acuoso:**

Luego de secar y pesar el residuo del extracto alcohólico se procedió a macerar con 250 mL de agua destilada durante 48 horas a temperatura ambiente; se filtró y se concentró en baño maría hasta sequedad (Yarlequé & Clavo, 2012).

## **3. Estudio de actividad biológica**

### **3.1 Actividad anti coagulante**

Se siguió el método descrito por (Theakston & Reid, 1983); así, se disolvió 1,07  $\mu\text{L}$  de veneno de *B. atrox* ( $\rho_r = 0.9384$ ), en 500  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7,2) y se pre incubó a 37

° C; se preparó una disolución madre (CM) con los extractos vegetales (Kunapi, Kurarina) de 4 ppm, disolviendo 0,02 mg de extracto seco en 5 mL de agua destilada o etanol absoluto, según corresponda. A partir de la CM se preparó diferentes diluciones 1/16 ( $C_1$ ), 1/32 ( $C_2$ ), 1/64 ( $C_3$ ) que se usaron para realizar el ensayo de anti coagulación.

Sobre un vidrio reloj se mezcló 300  $\mu$ L de plasma sanguíneo con 100  $\mu$ L de la disolución de veneno pre incubadas a 37°C por un lapso de 30 min para estimar el tiempo de coagulación del plasma (control positivo); ésta determinación se realizó por triplicado. Se mezcló 25  $\mu$ L de las diluciones de los extractos vegetales acuosos y alcohólicos con 100  $\mu$ L de la disolución de veneno, incubando ésta mezcla a 37°C por un lapso de 30 minutos; sobre un vidrio reloj se añadió a ésta mezcla 300  $\mu$ L de plasma humano y se midió el tiempo de coagulación con cronómetro; la determinación se realizó por triplicado para cada extracto. Como control negativo se utilizó 50  $\mu$ L de dilución de extracto vegetal.

### **3.2 Actividad anti proteolítica**

Para realizar ésta prueba se siguió el método de (Lomonte & Gutierrez, 1983), como se describe a continuación. A 2 mL de una disolución de caseína al 1% en PBS (pH 7,2) , se adicionó 1,0 mL de una disolución de veneno (0,02 mg/mL) en PBS (pH 7.2) y se incubó a 37°C por 30 minutos; la reacción fue detenida por la adición de 200  $\mu$ L ácido tricloroacético (ATA) al 5 %; se dejó en reposo por un lapso de 30 minutos, finalmente la mezcla se centrifugó a 500 rpm durante 20 minutos; se extrajo el sobrenadante con la ayuda de una micro pipeta, y se determinó su absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro JASCO V-730 (blanco positivo). Como blanco negativo se empleó la solución de caseína al 1% en PBS en la cual no se añadió la disolución de

veneno aplicando el mismo procedimiento. Se elaboró además disoluciones de los extractos vegetales en una concentración de 4 mg/mL.

Las pruebas de inhibición se realizaron pre incubando la mezcla veneno-extracto vegetal en proporción 1:20 a 37 °C por 30 minutos. Se adicionó 2 mL de la disolución de caseína al 1 % y se pre incubó nuevamente en las mismas condiciones; para detener la reacción se añadió 200 µL de ATA al 5% en agua destilada; se dejó reposar 30 minutos para después centrifugar a 5000 rpm por 20 minutos; se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro UV-VIS a 280 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado en los extractos correspondientes. La cantidad proteolítica se expresó en U/mg de veneno, dividiendo el cambio de absorbancia para los miligramos de veneno y multiplicando por 100, de la siguiente manera:

$$U/mg = \frac{\Delta A_{280}}{\text{mg veneno}} \times 100$$

Tomado de: (Lomonte & Gutierrez, 1983)

### **3.3 Perfil electroforético**

#### **3.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Éste procedimiento se utilizó para determinar el perfil proteico del veneno de *B. atrox*, antes y después de la acción de los extractos vegetales.

#### **3.4.5 Procedimiento para la corrida electroforética (SDS-PAGE)**

Se estandarizó del protocolo gel de poliacrilamida en cámara vertical de electroforesis para sistema SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes como se detalla a continuación:

## **A. Consideraciones generales.**

### **Limpieza:**

- Los vidrios del sistema y los peines fueron limpiados con alcohol al 70 % antes de su uso y secados a temperatura ambiente con ayuda de un paño seco libre de pelusa.
- La cámara de electroforesis y sus accesorios (tanque y tapa, soporte de goma) se limpiaron con agua destilada y secados a temperatura ambiente, teniendo especial cuidado con las resistencias de la cámara de electroforesis.

### **B. Reactivos:**

**Los reactivos se prepararon de acuerdo con lo indicado en el literal F de presente sección.**

- Los reactivos empleados deben tener el pH adecuado en función de las soluciones requeridas, el pH se reguló con HCl (37%) o NaOH 2M.
- La solución de acrilamida/bis acrilamida, Tris pH 6.8 y Tris pH 8.8 se almacenaron en refrigeración 4°C y protegidos de la luz.
- El tampón de electroforesis 1x (Tris Glicina), fue reutilizado por 4 o 5 ocasiones hasta tener que reemplazarlo.
- El APS se almacenó en alícuotas de 2 mL a -20°C hasta su uso.
- El tampón de la muestra se preparó antes de su uso, y el mercaptoetanol se añadió a las muestras justo antes de realizar la corrida.
- La solución de azul de bromo fenol al 1% (1 g de azul de bromo fenol en 100 mL de agua destilada), se almacenó a temperatura ambiente.

### **C. Preparación de muestras**

- **Veneno Patrón (VP):** a 1,07 µL de veneno se agregó 300 µL de buffer muestra

- **Extracto vegetal patrón (EVP):** a 1,2 mg de extracto se agregó 50  $\mu$ L de buffer muestra.
- **Veneno + extracto (V+E):** a 1,07  $\mu$ L de veneno se añadió 40  $\mu$ L de solución fisiológica; se mezcló con una disolución de 7 mg de extracto en 60  $\mu$ L de agua o alcohol, dependiendo el caso. Se incubó durante 30 minutos a 37°C; posteriormente se agregó a la mezcla 100  $\mu$ L de buffer muestra.
- **Proteína Patrón (PP):** Se mezcló 5  $\mu$ L del estándar de proteína con 15  $\mu$ L del buffer muestra.
- Todas las soluciones anteriores se calentaron a 100°C durante 5 minutos para producir la desnaturalización de las proteínas.

#### **D. Preparación de geles.**

- Se preparó de forma simultánea el gel de resolución (12%) y apilamiento (5%), sin colocar el TEMED de acuerdo con las tablas “Componentes de 1 mini gel”. Una vez incorporado el APS, se dejó en reposo la mezcla por 5 min antes de poner el TEMED en el gel de resolución, para acelerar el proceso de polimerización.
- Se preparó las placas de vidrio perfectamente limpias cubriendo su parte inferior con cinta masking para evitar fugas; se colocó los peines sobre las placas de vidrio y se midió 1 cm bajo el peine como medida para el gel de resolución. Las placas se sujetaron en el soporte para proceder a llenarlas con las soluciones de resolución y apilamiento como se describe a continuación.
- Se añadió TEMED en el gel de resolución y se mezcló con cuidado de no formar burbujas; se cargó el gel en la placa de vidrio hasta la marca anteriormente trazada, luego se añadió 1mL de etanol al 70% sobre el gel, para

brindar condiciones anaerobias y se esperó que el gel polimerice (aproximadamente 15 min).

- Se desechó el alcohol colocado invirtiendo el sistema y con la ayuda de un pedazo de papel filtro se retiró el exceso de alcohol presente en la superficie del gel de resolución, con cuidado de no dañar el mismo.
- Finalmente se colocó el TEMED en el gel de apilamiento y se mezcló con cuidado, se cargó el gel en la placa de vidrio hasta el borde superior, luego se colocó el peine con cuidado de no formar burbujas y se dejó polimerizar el gel (aproximadamente 15 min).

#### **E. Ensamblaje del sistema y corrida.**

- Una vez polimerizados los geles, se retiró el masking de las placas de vidrio y se ensambló la celda de electroforesis con el mejor ajuste posible, asegurándose de que el cristal que tiene la muesca debe ir hacia el interior de la celda.
- Posteriormente se llenó la cámara de electroforesis hasta el límite máximo con Tris Glicina 1x, y con mucho cuidado se retiró los peines de las celdas de vidrio.
- Se cargó las muestras y estándares preparados anteriormente en los pocillos del gel de apilamiento, en un volumen de 15- 20  $\mu\text{L}$ , en los pocillos centrales se colocó el veneno patrón (VP) y el estándar de proteína (PP) (5  $\mu\text{L}$  del estándar con 15  $\mu\text{L}$  del tampón de la muestra).
- Se colocó la tapa en la cámara de electroforesis y se ajustaron los cables en sus respectivos polos acoplados a la fuente de poder; se encendió el sistema y se corrió las muestras a 140 V y 26 mA por el lapso de una hora.
- Terminada la corrida, se abrió la cámara de electroforesis, se desmontó la celda de electroforesis para extraer las placas de vidrio, se extrajo el gel de resolución

separando con cuidado los vidrios que lo contienen; se desechó el gel de apilamiento y al gel de resolución se lo lavó 3 veces con agua destilada.

- Se colocó en un recipiente el gel de resolución con 60 mL de azul de Coomassie, y se lo llevó a agitación constante por una hora.
- Se lavó el gel de resolución con agua destilada por 3 min y se colocó en 60 ml de solución decolorante con agitación constante por una hora.
- Finalmente se observó las bandas obtenidas y procedió a fotografiar el gel de resolución con el patrón de proteínas resultante.
- Se limpió todos los implementos utilizados ya sea con alcohol o agua destilada hasta su próximo uso.

#### **F. Preparación De Reactivos.**

Tabla 8.  
Solución Tampón Tris-HCL 1,5 pH 8,8

	100 mL
Tris-base	18,17 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Ajustar el pH 8,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 mL

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 9.  
Solución tampón Tris- HCl 0,5 M pH 6,8

	100 mL
Tris-base	6,05 g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Ajustar en pH a 6,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 mL

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)



Tabla 10.  
Solución SDS 10%

	100 mL
SDS	10g
Disolver en 80 mL de agua destilada	
Agua destilada	Hasta 100 mL
*El SDS precipita si la temperatura ambiente es inferior a 18 °C. Calentar ligeramente favorece la reacción. **El SDS se debe manipular siempre con guantes y mascarilla.	

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 11.  
Poliacrilamida 30%

Acrilamida	29.2 g
Bis acrilamida	0.8 g
Agua destilada	Hasta 100 mL
Colocar la solución preparada en un frasco ámbar o cubierto de papel aluminio, mantener a 4°C.	

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 12.  
Componentes de 1 Minigel.

	Gel de resolución 12%	Gel de apilamiento 5%
Agua destilada (Tipo I)	3.3 mL	3.4 mL
Poliacrilamida 30%	4 mL	830 µL
Tris 1,5 M pH 8.8 / Tris 1M pH 6.8	2.5 mL	630 uL
SDS 10%	100 µL	50 µL
Persulfato de amonio	100 µL	50 uL
TEMED	20 µL	10 µL

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 13.  
Tampón muestra <sup>a</sup>

Tris HCl pH 6,8	1 mL
Glicerol	8,8 mL
SDS 10%	1,6 mL
Azul de Bromofenol 1% <sup>b</sup>	0,4 mL
2-mercaptoetanol <sup>c</sup>	0,4 mL
Agua destilada	3 mL
<sup>a</sup> Debe prepararse inmediatamente antes de usar. Alternativamente se puede preparar y mantener a temperatura ambiente, sin el 2-mercaptoetanol, y añadir éste inmediatamente antes de su uso. <sup>b</sup> Utilizar una solución concentrada previamente preparada que contiene 1 g disuelto en 100 ml de agua destilada. <sup>c</sup> Manipular en campana, ya que el 2-mercaptoetanol es tóxico y huele muy mal.	

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 14.  
Tampón de electroforesis 10X Tris Glicina pH 8,3

	1 L
Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Disolver en 800 mL de agua destilada	
Ajustar el pH a 8,3 con HCl concentrado	
Agua destilada	Hasta 1 L

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 15.  
Tampón de electroforesis 1X Tris-Glicina pH 8,3

	1 L
Solución concentrada 10X	100 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 16.  
Solución decolorante de geles <sup>a</sup>

	1 L
Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Agua destilada	Hasta 1 L
<sup>a</sup> Se debe prepara en la campana de gases, ya que el metanol es tóxico	

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 17.  
Azúl de Commassie<sup>a</sup>

	1 litro
Etanol 96%	450 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Agua destilada	500 mL
Azul de Commassie (Fluka 27816)	2.5 g
<sup>a</sup> Mezclar los tres líquidos; añadir azul de Coomassie, agitar toda la noche hasta que se disuelva. Filtrar y almacenar en frasco ámbar.	

Fuente: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

Nota: Realizado por el autor (2017)

## Capítulo III

### Resultados y discusiones

#### 3.1 Resultados

Para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos para las pruebas de anti proteólisis y anti coagulación se utilizó INFOSTAT versión 2017, y para la elaboración de gráficas estadísticas se utilizó el software RStudio versión 1.0.153.

##### 3.1.1 Actividad Anti coagulante

Las Tablas 18, 19, muestran que el extracto alcohólico es más efectivo sobre acuoso, y también nótese que entre más diluido se encuentran los extractos vegetales disminuyen la efectividad de los mismos. (Anexos 5, 6, 7, 8).

Tabla 18.

Tiempo medio de Coagulación del plasma sanguíneo con extractos de *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)

Especie	Extracto	Diluciones	Tiempo de coagulación (s)	
Kurarina	Acuoso	1/16	Testigo	Tratamiento
			3,66	9,33
			3,66	4,66
		1/64	3,66	4,00
	Alcohólico	Diluciones	Testigo	Tratamiento
		1/16	3,66	19,66
		1/32	3,66	11,66
		1/64	3,66	11,00

Nota: Realizado por el autor (2017)

Tabla 19.

Tiempo medio de Coagulación de plasma sanguíneo con extractos de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi).

Especie	Extracto	Diluciones	Tiempo de coagulación (s)	
Kunapi	Acuoso	1:16 1:32 1:64	Testigo	Tratamiento
			3,66	8,66
			3,66	4,00
	Alcohólico	Diluciones 1:16 1:32 1:64	Testigo	Tratamiento
			3,66	23,00
			3,66	21,00
			3,66	12,66

Nota: Realizado por el autor (2017)

### 3.1.1.1. Análisis estadístico de la prueba anti coagulante

Tabla 20.

Análisis de varianza (ANOVA) para el tiempo de coagulación

Análisis de varianza (SV Tipo II)					
F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	1747,58	11	158,87	10,24	< 0,0001
Tratamiento	1638,67	5	327,73	21,12	< 0,0001
Especie	34,38	1	34,38	2,22	0,1470
Tratamiento* Especie	74,54	5	14,91	0,96	0,4573
Error	465,50	30	15,52		
Total	2213,08	41			
F.V: Fuente de variación, SC: Suma de cuadrados, Gl: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F: Valor de f, p-valor: Valor de p					

Nota: Realizado por el autor (2017)

El análisis de ANOVA (Tabla 20), determinó que el aumento en el tiempo de coagulación es significativo para los tratamientos (veneno + extracto + plasma) al compararlo con el tiempo de coagulación del blanco positivo (veneno + plasma),

mientras que, no existe diferencia significativa para el tiempo de coagulación entre especies, ni en la interacción tratamiento - especie con ( $p > 0,05$ ).

Tabla 21.

Rangos de significancia para extractos alcohólico y acuoso de Kunapi y Kurarina

<b>Test: Tukey</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>Rangos</b>		
C <sub>1</sub> AL	21,33	A		
C <sub>2</sub> AL	14,08		B	
C <sub>1</sub> AQ	9,00		B	C
C <sub>2</sub> AQ	4,33			C
C <sub>3</sub> AQ	3,83			C
Testigo	3,66			C
<b>AL: Extracto Alcohólico, AQ: Extracto acuoso, C<sub>1</sub>: Concentración</b>				

Nota: Realizado por el autor (2017)

Como se observa en la Tabla 21, al realizar la prueba de Tukey al 5%, con relación a los tratamientos comparados con la actividad anti coagulante, se puede determinar que existen 3 rangos de significancia. El rango A pertenece al tratamiento más efectivo y corresponde al realizado con la concentración 1 extracto alcohólico. Mientras que el tratamiento con menor eficacia es el rango C, perteneciente a la concentración tres, en extracto acuoso (C<sub>3</sub> AQ).

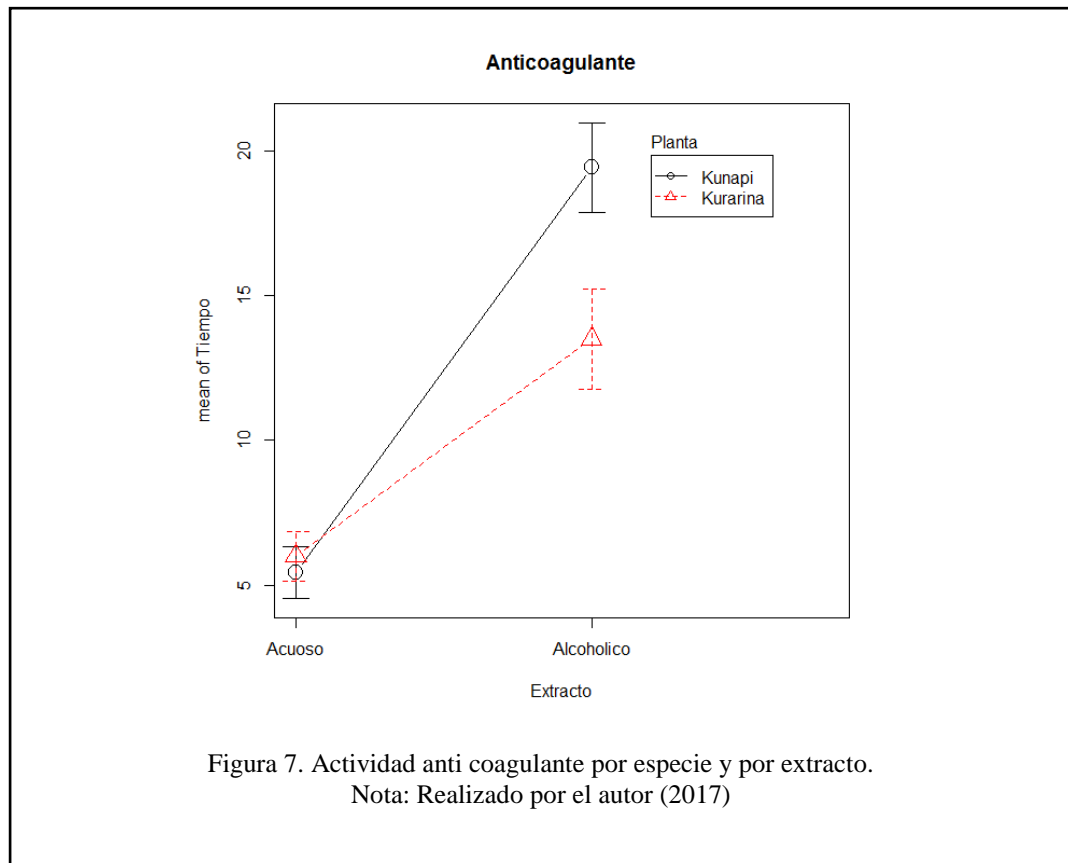
Tabla 22.

Rangos de significancia para Kunapi y Kurarina

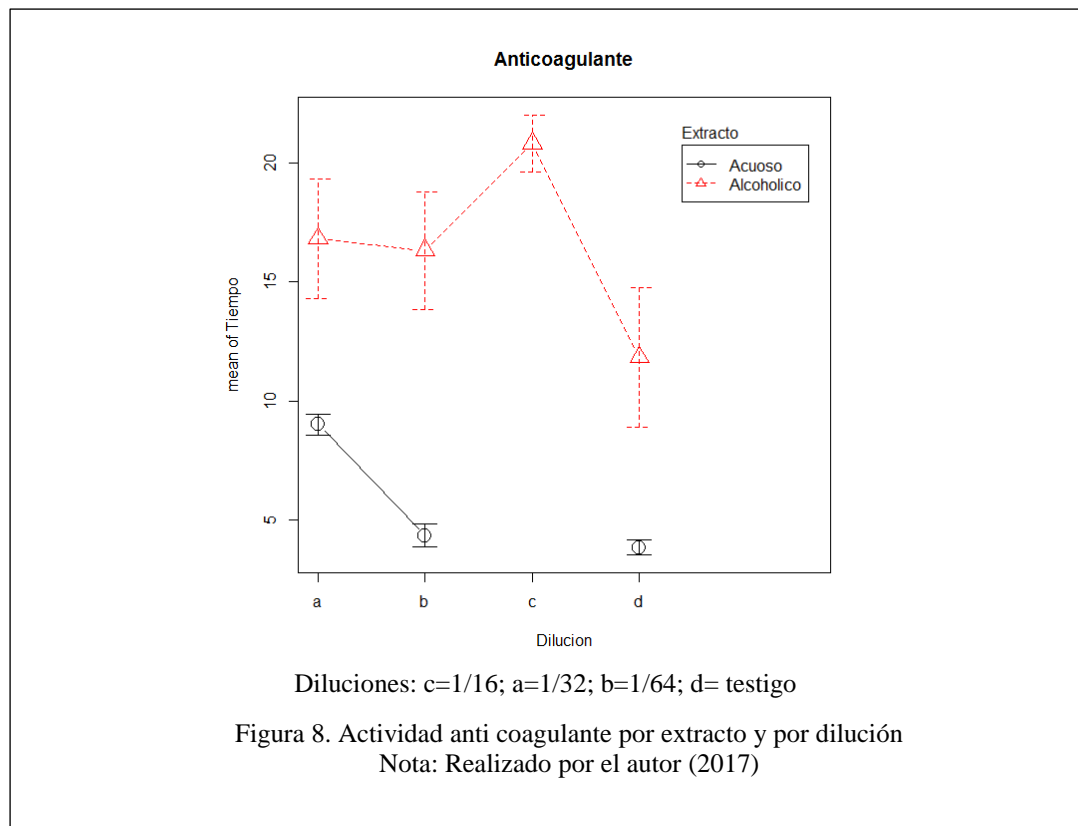
<b>Test: Tukey</b>		
<b>Especie</b>	<b>Media</b>	<b>Rango</b>
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav (Kunapi)	9,97	A
<i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina)	8,78	A

Nota: Realizado por el autor (2017)

Según la prueba de Tukey al 5% analizada en la Tabla 22, se puede observar que existe un rango de significancia, perteneciente al tratamiento A; es decir la especie *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav (Kunapi) es tan efectiva como la especie *Minthostachys cf. mollis* (kunt) Griseb. (Kurarina).

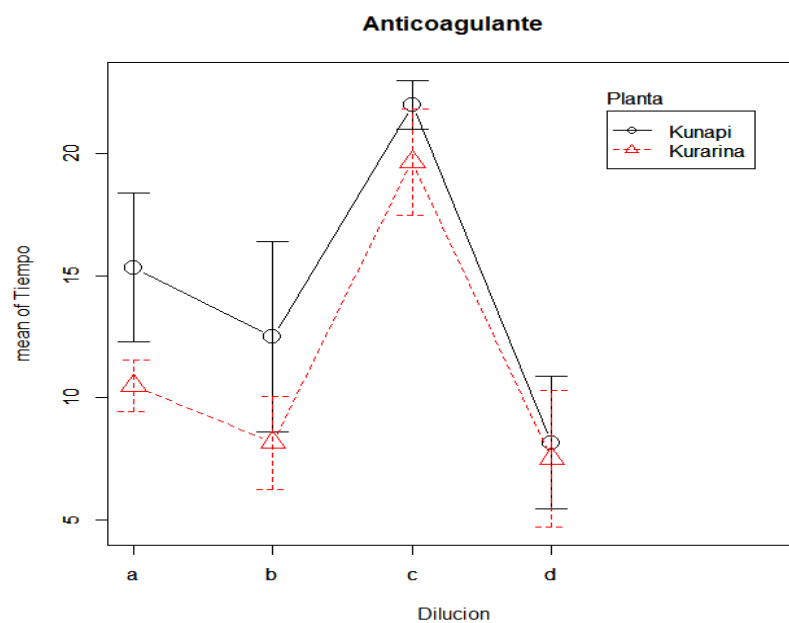


En la figura 7. Se observa que, para la prueba anti coagulante, es más efectiva la especie Kunapi sobre la Kurarina, así como también se determina que el extracto alcohólico es más eficaz el extracto acuoso.



La figura 8. Muestra que el extracto acuoso es el menos efectivo, siendo el más efectivo el alcohólico en concentración c perteneciente al tratamiento C<sub>3</sub> en extracto alcohólico.





Diluciones: c=1/16; a=1/32; b=1/64; d= testigo

Figura 9. Actividad anti coagulante por especie y por dilución

Nota: Realizado por el autor (2017)

La figura 9. Muestra que Kunapi y Kurarina tienen la misma actividad anti coagulante en la concentración c perteneciente al tratamiento C<sub>1</sub> (dilución 1/16).

### 3.1.2 Actividad Anti proteólisis

Tabla 23.

Disminución de la actividad proteolítica del veneno de *B. atrox* por acción de extractos de Kurarina y Kunapi a 280 nm.

Especie	Tratamiento	Absorbancia (280 nm)	U/mg
<i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb (Kurarina).	E <sub>Al</sub> +Cas+Ven	0,3469	650,95
	E <sub>Aq</sub> +Cas+Ven	0,2640	256,19
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav. (Kunapi).	E <sub>Al</sub> +Cas+Ven	0,1307	378,57
	E <sub>Aq</sub> +Cas+Ven	0,0982	533,33
B. Positivo	Cas+Ven	0,2102	
B. negativo	Cas + ATA	0.1019	
<b>E<sub>Al</sub>= Extracto alcohólico, E<sub>Aq</sub>= Extracto acuoso, Cas= Caseína, Ven= veneno</b>			

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 23 se muestra la absorbancia a 280 nm de los tratamientos realizados con los extractos alcohólico y acuoso de las especies estudiadas, los blancos negativo y positivo y, la actividad proteolítica calculada en cada tratamiento (U/mg) (Anexos 12, 13, 14, 15). Un valor más alto en U/mg indica mayor actividad proteolítica.

### 3.1.2.1 Análisis estadístico de la prueba anti proteolítica

Tabla 24.

Análisis de varianza (ANOVA) para determinar prueba anti proteolítica

<b>Análisis de varianza (SV Tipo II)</b>					
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0,12	3	0,04	8,80	0,0065
Especie	0,11	1	0,11	23,81	0,0012
Tratamiento	0,01	1	0,01	2,18	0,0179
Error	0,04	8	4,6E-03		
Total	0,16	11			
<b>F.V: Fuente de variación, SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: cuadrados medios, F: Valor de f, p-valor: Valor de p</b>					

Nota: Realizado por el autor (2017)

Al realizar el análisis de ANOVA (Tabla 24), se puede determinar que existe diferencia significativa para actividad anti proteolítica entre tratamientos (tipo de extracto) y especies, y con relación al blanco positivo con ( $p < 0,05$ ).

Tabla 25.

Rangos de significancia para actividad proteolítica por extracto

<b>Test: Tukey</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Rango</b>
Aq	0,10	A
Al	0,24	B
<b>Aq= acuoso, Al= alcohólico</b>		

Nota: Realizado por el autor (2017)

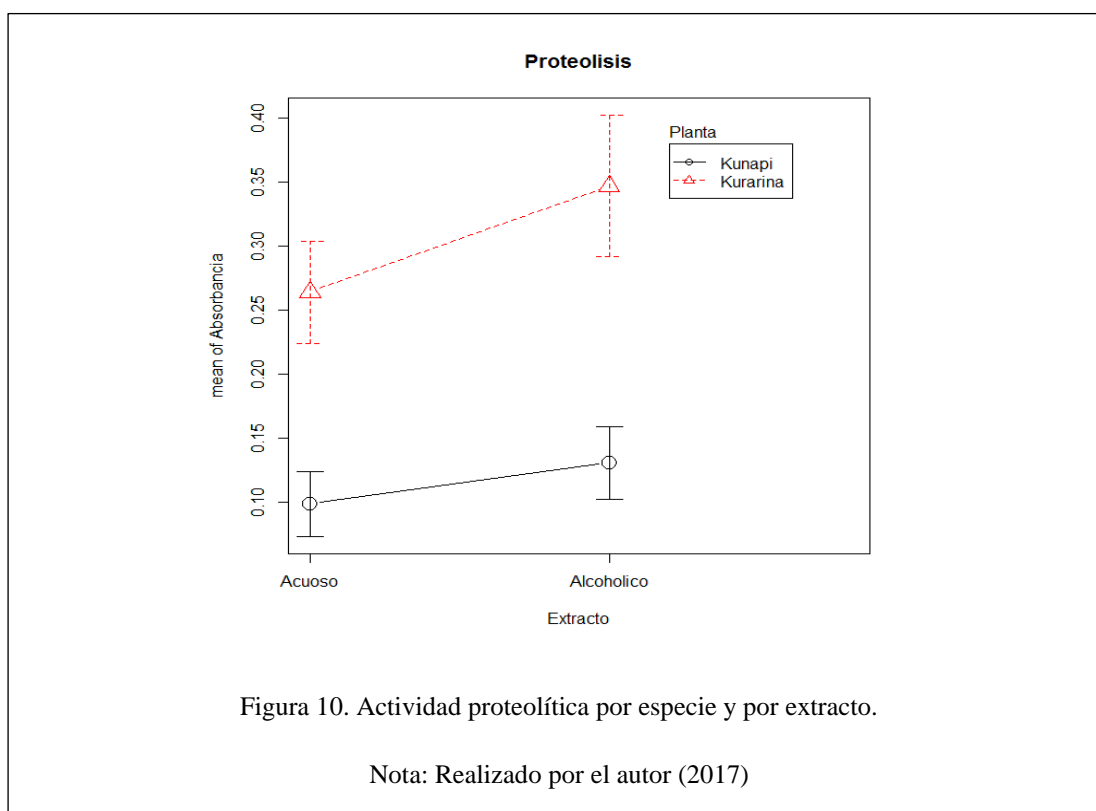
Según la prueba de Tukey al 5% (Tabla 25.), se puede observar que existe dos rangos de significancia al analizar la actividad proteolítica, siendo el extracto acuoso (A) el que tiene mayor eficacia para inhibir la proteólisis.

Tabla 26.  
Rangos de significancia para actividad proteolítica por especie

Test: Tukey		
Especie	Media	Rango
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav	0,11	A
<i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb	0,35	B

Nota: Realizado por el autor (2017)

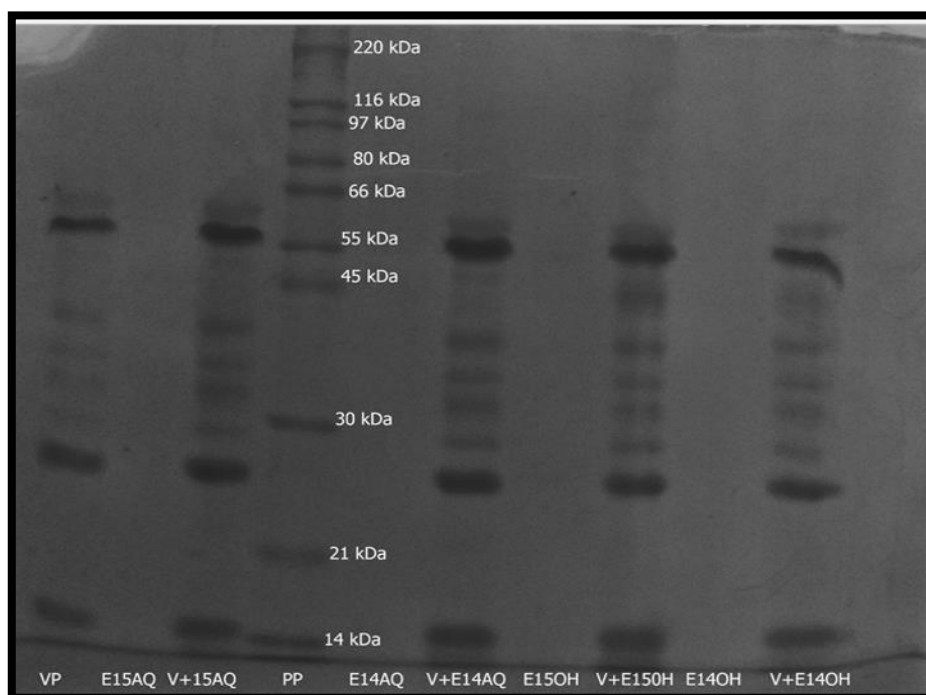
Según la prueba de Tukey al 5% (Tabla 26), se puede observar que Kunapi (*T. sananho*) inhibe la proteólisis de forma más eficaz que Kurarina (*M. mollis*)



La figura 10., muestra que la especie Kunapi es más efectiva que la Kurarina, además indica que el extracto acuoso es más efectivo sobre el alcohólico ya que se inhibe la proteólisis causada por el veneno de *B. atrox*

### 3.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

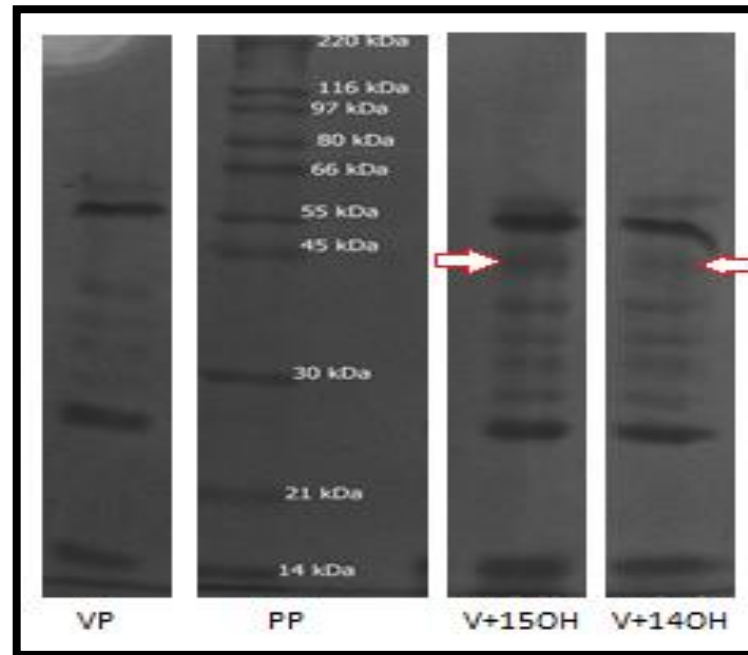
Como se observa en la figura 11 y 12, la mezcla de veneno con los extractos alcohólicos de (V+E15OH), (V+E14OH) Kurarina y Kunapi respectivamente presentan una banda adicional en comparación a los extractos acuosos de (V+15AQ), (V+14AQ) Kurarina y Kunapi no presentan dicha. (Anexo 16).



VP= veneno patrón; E15AQ= extracto acuoso de Kunapi; V+15AQ= veneno + extracto acuoso de Kunapi; PP= Proteína patrón; E14AQ= extracto acuoso de Kurarina; V+E14AQ= veneno + extracto acuoso de Kurarina; E15OH= extracto alcohólico de Kunapi; V+E15OH= veneno + extracto alcohólico de Kunapi; E14OH= extracto alcohólico de Kurarina; V+E14OH= veneno + extracto alcohólico de Kurarina

Figura 11. Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes  
Tomada por: El autor (2017)

El revelado del gel de poliacrilamida muestra que el conjunto de veneno más extractos alcohólicos de Kurarina (V+E14OH), y Kunapi (V+E15OH) presentan una banda extra en comparación con el veneno patrón (VP) perteneciente a un peso de 45,8 kDa, por lo cual se dice que estas especies vegetales tienen actividad alexíttera, mientras que los extractos acuosos no presentan ésta banda (Figura 8).



VP= veneno patrón; PP= Proteína patrón; V+E15OH= veneno + extracto alcohólico de Kunapi; V+E14OH= veneno + extracto alcohólico de Kurarina

Figura 12. Electroforesis vertical del extracto alcohólico de Kunapi y Kurarina  
Elaborada por: El autor, 2017

Tabla 27.  
Número de bandas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Componentes sembrados	Número de bandas
VP	8
E15AQ	0
V+15AQ	8
E14AQ	0
V+E14AQ	8
E15OH	0
V+E15OH	9
E14OH	0
V+E14OH	9

**VP=** veneno patrón; **E15AQ=** extracto acuoso de Kunapi; **V+15AQ=** veneno + extracto acuoso de Kunapi; **E14AQ=** extracto acuoso de Kurarina; **V+E14AQ=** veneno + extracto acuoso de Kurarina; **E15OH=** extracto alcohólico de Kunapi; **V+E15OH=** veneno + extracto alcohólico de Kunapi; **E14OH=** extracto alcohólico de Kurarina; **V+E14OH=** veneno + extracto alcohólico de Kurarina

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 27 se muestra el número de bandas generadas en la corrida de electroforesis SDS-PAGE para los estándares y tratamientos de acuerdo a la Fig. 7. De acuerdo a la posición de cada banda en los tratamientos y el estándar de proteína, se puede estimar su peso molecular.

### Determinación del peso molecular de las proteínas

Para la determinación del peso molecular de las proteínas se tomó en consideración la siguiente fórmula, sabiendo que la distancia que migra el frente al gel es de 72 mm (Df). (Anexo 17).

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína (Dp)}}{\text{Distancia que migra el frente al gel (Df)}}$$

Tomado de: (Maldonado & Jorrín, s.f.)

En las tablas 28-31 se muestran los pesos moleculares (kDa) calculados para las bandas electroforéticas observadas en gel de poliacrilamida para el veneno de *B. atrox* y los

tratamientos con los extractos acuosos y alcohólicos de Kurarina (*M. mollis*) y Kunapi (*T. sananho*).

Tabla 28.

Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de *B. atrox*

Recorrido de banda (mm) (Dp)	Rf (mm)	Peso molecular (kDa) VP
19 mm	0,26	53,2 kDa
22 mm	0,31	42,5 kDa
32 mm	0,44	39,7 kDa
36 mm	0,50	36 kDa
39 mm	0,54	32,4 kDa
42 mm	0,58	27,5 kDa
43 mm	0,60	25 kDa
65 mm	0,90	14 kDa
VP= Veneno patrón de <i>B. atrox</i> ; Rf= movilidad de la molécula; Dp: Distancia que migra una determinada proteína.		

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 28 se muestran las bandas generadas por el veneno patrón de *B. atrox* de acuerdo a su migración en el gel de poliacrilamida, siendo un total de 8 bandas, para las cuales se han calculado sus respectivos pesos moleculares en kDa.

Tabla 29.

Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de *B. atrox* tratado con el extracto acuoso del Kunapi

Recorrido de banda (mm) (Dp)	Rf (mm)	Peso molecular en (kDa) V+E <sub>15AQ</sub>
19 mm	0,26	53,2 kDa
22 mm	0,31	42,5 kDa
32 mm	0,44	39,7 kDa
36 mm	0,50	36 kDa
39 mm	0,54	32,4 kDa
42 mm	0,58	27,5 kDa
43 mm	0,60	25 kDa
65 mm	0,90	14 kDa
V+E <sub>15AQ</sub> = Veneno de <i>B. atrox</i> + Extracto acuoso de Kunapi; Rf= movilidad de la molécula; Dp= Distancia que migra una determinada proteína.		

Nota: Realizado por el autor (2017)



En la Tabla 29 se muestran las bandas electroforéticas para el veneno de *B. atrox* tratado con extracto acuoso de Kunapi; nótese que no existe cambio en el número y posición relativa de las mismas en el gel de poliacrilamida.

Tabla 30.

Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de *B. atrox* tratado con el extracto acuoso de Kurarina

Recorrido de banda (mm) (Dp)	Rf (mm)	Peso molecular en (kDa) V+E <sub>14AQ</sub>
19 mm	0,26	53,2 kDa
22 mm	0,31	42,5 kDa
32 mm	0,44	39,7 kDa
36 mm	0,50	36 kDa
39 mm	0,54	32,4 kDa
42 mm	0,58	27,5 kDa
43 mm	0,60	25 kDa
65 mm	0,90	14 kDa
V+E <sub>14AQ</sub> = Veneno de <i>B. atrox</i> + Extracto acuoso de Kurarina; Rf= movilidad de la molécula; Dp= Distancia que migra una determinada proteína.		

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 30 se muestran las bandas electroforéticas para el veneno de *B. atrox* tratado con extracto acuoso de Kurarina; nótese que no existe cambio en el número y posición relativa de las mismas en el gel de poliacrilamida.

Tabla 31.

Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de *B.atrox* tratado con el extracto alcohólico de Kunapi

Recorrido de banda (mm) (Dp)	Rf (mm)	Peso molecular en (kDa) V+E <sub>15OH</sub>
19 mm	0,26	53,2 kDa
22 mm	0,31	48,5 kDa
<b>43 mm</b>	<b>0,47</b>	<b>45,8 kDa</b>
32 mm	0,44	39,7 kDa
36 mm	0,50	36 kDa
39 mm	0,54	32,4 kDa
42 mm	0,58	27,5 kDa
43 mm	0,60	25 kDa
65 mm	0,90	14 kDa
V+E <sub>15OH</sub> = Veneno de <i>B. atrox</i> + Extracto alcohólico de Kunapi; Rf= movilidad de la molécula, Dp: Distancia que migra una determinada proteína.		

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 31 se muestran las bandas electroforéticas para el veneno de *B. atrox* tratado con extracto alcohólico de Kunapi; nótese que existe cambio en el número y posición relativa de las mismas en el gel de poliacrilamida, específicamente la banda con peso molecular de 48,5 kDa.

Tabla 32.

Pesos moleculares y movilidad electroforética del veneno de *B. atrox* tratado con el extracto alcohólico de Kurarina

Recorrido de banda (mm) (Dp)	Rf (mm)	Peso molecular en (kDa) V+E <sub>14OH</sub>
19 mm	0,26	53,2 kDa
22 mm	0,31	48,5 kDa
<b>43 mm</b>	<b>0,47</b>	<b>45,8 kDa</b>
32 mm	0,44	39,7 kDa
36 mm	0,50	36 kDa
39 mm	0,54	32,4 kDa
42 mm	0,58	27,5 kDa
43 mm	0,60	25 kDa
65 mm	0,90	14 kDa
V+E <sub>15OH</sub> = Veneno de <i>B. atrox</i> + Extracto alcohólico de Kunapi; Rf= movilidad de la molécula, Dp: Distancia que migra una determinada proteína.		

Nota: Realizado por el autor (2017)

En la Tabla 32 se muestran las bandas electroforéticas para el veneno de *B. atrox* tratado con extracto alcohólico de Kurarina; nótese que existe cambio en el número y posición relativa de las mismas en el gel de poliacrilamida, específicamente la banda con peso molecular de 48,5 kDa.

## Discusión

La investigación etnomédica inicia en el conocimiento ancestral de los pueblos y nacionalidades indígenas, quienes ven en las plantas el medio natural que el ser humano tiene a su alcance para curar sus enfermedades. Las propiedades medicinales atribuibles a las plantas, de acuerdo con su uso, constituyen la primera pista para iniciar un estudio de actividad biológica que en lo posterior puede resultar en el descubrimiento de nuevos y mejores principios activos que ayuden a la sociedad a mejorar su calidad de vida.

Es interesante que las comunidades indígenas de la nacionalidad Shuar identifiquen un sin número de plantas usadas para mitigar el efecto del veneno de las serpientes, en especial, de la “Pitalala” (*B. atrox*), por lo que en la selva tienen a disposición su farmacia natural, de tal forma que, al internarse en ella tienen una preocupación menos cuando de ofidios se trata; llevan cargados en sus “morrales” una cantidad suficiente de las partes aéreas o subterráneas de las plantas que ellos identifican como antídotos y permanecen con ellas hasta regresar a su hogar.

Partiendo de esa valiosa información preliminar, se ha comprobado *in vitro* a través de la aplicación de técnicas de ensayo conocidas en el estado del arte, que los extractos totales secos de *Tabernaemontana sananho* y *Minthostachys mollis* tienen actividad anti proteolítica y anti coagulante; los resultados obtenidos permiten apreciar que los extractos alcohólicos de las hojas son más eficaces como anti coagulantes y anti proteolíticas, evidenciado aún más por la alteración que producen en el perfil proteico del veneno de *B. atrox*.

Estudios anteriores realizados sobre actividad alexitéra de estas dos especies como en (Muñoz & Tapia, 2017) y en (Cueva & Tapia, 2017) complementan ésta investigación

ya que, en ellas se determinó su perfil químico y se demostró que los extractos alcohólicos de las partes aéreas de estas dos especies tienen actividad anti hemolítica. El perfil químico de estas dos especies demuestra la presencia de polifenoles, flavonoides, y alcaloides que, de acuerdo con lo establecido en Torres (2015) brindan a estas dos especies vegetales actividad alexítera.

El análisis del perfil proteico del veneno de *B. atrox* se realizó en vista de lo informado por (Camargo & otros, 2011), en donde se afirma que existe una fuerte correlación tanto en actividades anti coagulantes como en actividades anti proteolíticas de los extractos vegetales sobre el veneno de serpientes, con la técnica de electroforesis vertical en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), ya que un cambio en el número de bandas en el gel, por aparición, desvanecimiento o aumento de las mismas, resulta en una buena aproximación a la confirmación de actividad alexítera, esto último apreciado nuevamente en los extractos alcohólicos, no así en los acuosos. El acervo mundial en investigaciones relacionadas a actividad alexítera de especies vegetales es muy grande, sin embargo, no se ha encontrado literatura relacionada a las especies investigadas en éste proyecto, resaltando por ello la importancia que tiene la comprobación de la actividad biológica revelada por los pueblos y nacionalidades indígenas ecuatorianas en estudios de laboratorio que orienten a las personas que en su búsqueda de información biológica, se internan en la selva y puedan ser víctimas de accidente bothrópico.

## Conclusiones

Las especies *Tabernaemontana sananho* (Kunapi) y *Minthostachys mollis* (Kurarina) tienen actividad alexítera evidenciada por a su capacidad de inhibir *in vitro* la proteólisis y coagulación sanguínea producida por el veneno de *B. atrox*.

Los extractos secos totales acuosos y alcohólicos de las hojas de Kunapi y Kurarina, presentan actividad alexítera sobre el veneno de *B. atrox*, no obstante, el extracto alcohólico de las dos especies es más activo.

Concentraciones de veneno muy bajas (0,02 mg/mL) coagulan el plasma sanguíneo en aproximadamente 4 segundos, siendo necesaria una concentración de extracto alcohólico seco en disolución igual o superior a 0,25 ppm de Kunapi o Kurarina, la necesaria para neutralizar la actividad coagulante del veneno y aumentar el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo en aproximadamente 500%.

El extracto acuoso de Kunapi es más eficaz como inhibidor del efecto proteolítico del veneno de *B. atrox* que su extracto alcohólico en vista de que provoca una disminución de la absorbancia del testigo positivo a valores similares a los del testigo negativo. No se observa efecto anti proteolítico en Kurarina.

Los extractos alcohólicos de ambas especies, Kunapi y Kurarina, modifican el perfil proteico del veneno de *B. atrox* por el aparecimiento de una banda de 45,8 kDa inexistente antes del tratamiento en las condiciones del ensayo.

## 6. Lista de referencias

- Alarcón, K., & Baldeón, N. (s.f.). *Scrib: Proteólisis celular*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/342761840/Proteolisis-Celular>
- Barreto, E. (5 de noviembre de 2013). *Prezi*. Obtenido de <https://prezi.com/slzlbdvniwtg/plantas-alexiteras/>
- BIO-RAD. (s.f.). *BIO-RAD Laboratories Inc*. Obtenido de [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf)
- Camargo, F., & otros, y. (2011). SDS-PAGE una herramienta útil en la evaluación preliminar de actividad alexítera en extractos vegetales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 429-434.
- Campbell, Lamar, & Brodie. (2011). *The venomous reptiles of the western hemisphere ( Ied)*. New: York: Comstock associates.
- Cano. (2007). Actividad antimicótica in vitrio y elucidación estructural del aceite esencial de *Minthostachis mollis* (muña). *Ciencia e Investigación*, 28-30.
- Carrillo, J. &. (2013). Evaluación del procedimiento de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 19-26.
- Castro, L. (13 de julio de 2016). *Viviendo bien: Hemólisis* . Obtenido de <https://www.viviendobien.net/hemolisis/>
- Córdoba, G., & Santos, D. (20 de Marzo de 2015). Factores asociados con las complicaciones de un accidente ofídico en pacientes que ingresaron al Hospital General del Puyo en la provincia de Pastaza en el periodo enero 2007 a diciembre de 2013. Quito, Pichincha, Ecuador.

Cueva, Chanfuél, & Erazo. (12 de abril de 2010). *Scribd: Mordeduras de serpientes Ecuador UCE*. Obtenido de

<https://es.scribd.com/doc/37576705/MORDEDURA-DE-SERPIENTES-ECUADOR-UCE-FCM-EM>

Cueva, J. (2017). *Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de B. atrox sobre los extractos de Tabernaemontana L. sananho Ruiz y Pav. y Mucuna cf. elliptica (Ruiz y Pav) DC*. Universidad Politecnica Salesiana : Ecuador: Quito.

Cueva, V., & Tapia, W. (marzo de 2017). *Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de Bothrops atrox por los extractos de Tabernaemontana sananho Ruiz & Pav. Y Mucuna cf. elliptica (Ruiz&Pav.) dc*. Universidad Politécnica Salesiana: Ecuador, Quito. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13577>

Cultek. (2006). *Electroforesis de proteínas: Protocolos y tecnicas* . Obtenido de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-electroforesis-protocolos.pdf>

DICA, M. (s.f.). *Plantas alexíteras*. Obtenido de [http://www.innovacion.gob.sv/inventa/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6179:plantas-alexitericas&catid=135:farmaceutica&Itemid=306](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/index.php?option=com_content&view=article&id=6179:plantas-alexitericas&catid=135:farmaceutica&Itemid=306)

Elechosa, & Mercedes. (2009). Desarrollo de tecnologías inovativas para la explotación, conservación y utilización de plantas aromáticas nativas. *Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de Argentina*, 14.



- Fernández, G. (2013). *Interferencias analíticas: Hemólisis*. Obtenido de <http://www.hgucr.es/wp-content/uploads/2013/01/hemolisis.pdf>
- Fernández, T. (1 de febrero de 2017). *Manifestaciones clinicas y tratamientos de las mordeduras por serpientes del genero Bothrops*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/g3n3xiitap/mordedura-por-serpientes-del-gnero-bothrops>
- FMH, F. m. (enero de 2014). *Transtornos de la coagulación*. Obtenido de <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=1314>
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG*, 31-41.
- GDA Huamboya, M. (2017). *Municipalidad del cantón de Huamboya*. Obtenido de <http://www.huamboya.gob.ec/portal/index.php/contenido/item/informacion-general>
- Gonzales, & Díaz. (2013). *Incidencias por animales ponzoñosos en el Hospital General Azipatán de Zaragoza de enero de 2010 a diciembre de 2012* . Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/14217>
- Holm-Nielsen, Kvist, & Aguavil. (1983). Las investigaciones etnobotánicas entre los Colorados y los Cayapas. Informe preliminar. *Miscelánea Antropológica Ecuatoriana* 3, 89-116.
- Jara, Lozada, & Peñaranda. (2014). Conocimiento, Actitudes, y Practicas sobre la mordedura de Ofidio. (*Tesis de Pregrado*). Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas.
- Kvist, L. (1986). Gesneriads y snake bite. *The Gloxinian* 36(1), 8-13.

- Lomonte, & Gutierrez. (1983). La actividad proteolítica de los veneos de serpiente de Costa Rica sobre la caseína. *Biología Tropical*, 37-40.
- Lomonte, B. (2007). Electroforesis en gel de poliacrilamida. En B. Lomonte, *Manual de métodos inmunológicos* (págs. 92-101). San José de Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Lomonte, B., & Gutierrez, J. M. (1983). La actividad proteolítica de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Revista de Biología Tropical*, 37-40.
- López, & Saez. (2009). Plantas alexitéricas: Antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. *Medicina naturista*, 17-24. Obtenido de [www.aulamedica.es/gdcr/index.php/nh/article/download/3338/3338](http://www.aulamedica.es/gdcr/index.php/nh/article/download/3338/3338)
- López, J. (2017). *Saludeo: Propiedades y beneficios medicinales de la muña*. Obtenido de <https://www.saludeo.com/propiedades-beneficios-medicinales-muna/>
- López, J., & Pérez, J. (2009). Plantas alexíteras: antídotos vegetales contra picaduras de serpientes venenosas . *Medicina naturista: Vol 3- N°1*, 17-24.
- Maldonado, & Jorrín. (s.f.). *Departamento de Bioquímica en Ingeniería Molecular: Campus Universitario de Rabanales*,. Obtenido de <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
- Maldonado, A. (2016). *Mordeduras de serpientes* . Obtenido de <http://www.reeme.arizona.edu/materials/Mordeduras%20de%20serpiente%20CIATOX.pdf>

Mors. (1991). Plants active against snakebite. *Economic y Medicinal Plant Research*, 353-373.

MSP, E. (2008). *Manual de normas y procedimientos sobre prevención y tratamiento de accidentes ocasionados por mordedura de serpiente*. Obtenido de <https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/asoc/HASH32e5.dir/doc.pdf>

Muñoz, C., & Tapia, W. (marzo de 2017). *Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de Bothrops atrox por los extractos de Minthostachys cf. mollis (Kunth) Griseb y Pollalesta discolor (Kunt) Aristeg*. Universidad Politecnica Salesiana: Ecuador, Quito. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13642>

Omenexus. (30 de noviembre de 2016). *Entheogenic University :Tabernaemontana sanano Ruiz & Pav*. Obtenido de <https://www.dmt-nexus.me/forum/default.aspx?g=posts&t=1546>

Omenexus. (16 de diciembre de 2016). *Entheogenic University :Tabernaemontana sanano Ruiz & Pav (Kunapi)*. Obtenido de <https://www.dmt-nexus.me/forum/default.aspx?g=posts&t=73381>

OMS. (2008). *Manual de normas y procedimientos sobre prevención de traamientos de accidentes ocasionados por mordeduras de serpiente* . Obtenido de <https://bibliotecapromocion.msp.gob.ec/greenstone/collect/promocin/index/asoc/HASH32e5.dir/doc.pdf>

Pazmiño, & Otamendi. (23 de abril de 2014). *Reptilia web: Bothrops atrox*. Obtenido de <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621>

- Pereañaez, & Jiminez. (2008). Inhibicion de las actividades proteolitica, coagulante, hemolítica por veneno de *B. asper* sobre extractos alcoholicos de tres especies de heliconias. *Revista de la facultad de química farmacéutica* , 157-164.
- Pérez, A. (8 de septiembre de 2013). *Manual de accidente ofídico*. Obtenido de <http://manual-ofidico.blogspot.com/2013/09/accidente-bothropico.html>
- PUCE, U. (23 de abril de 2014). *Reptilia web Ecuador: Bothrops atrox*. Obtenido de <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/FichaEspecie.aspx?Id=1621>
- Quesada, J., & Aguilera, E. (junio de 2012). Prevención y manejo de mordeduras de serpientes. *Scielo*, 369-380.
- Reyes, M. (25 de marzo de 2016). *Repositorio: Universidad Politécnica Salesiana*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13640/1/UPS-QT11435.pdf>
- Sadzawka, A., & Carrasco, A. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. Santiago de Chile: Instituto de Regiones Agropecuarias.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 16-22.
- Serpentario Nacional de Colombia, M. (2017). *Bothrops atrox (mapaná, mapanare, marba amarilla, pudridora)*. Obtenido de <http://www.serpientesdecolombia.com/bothrops-atrox-mapana-mapanare-barba-amarilla/#1483904969141-6e0918a9-3633>
- Sumpa, P., & Pakunt. (2013). *Plantas medicinales en la mordedura de serpiente en la comunidad achuar Kaipach*. Ecuador, Cuenca: Universidad de Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/20110>

- Theakston, & Reid. (1983). Inhibición de las actividades proteolíticas coagulante y hemolítica indirectas inducidas por el veneno de *B. asper* por extractos etanólicos de tres especies de Heliconias. *VITA E, Revista de la facultad de Química Farmacéutica.*, 157-164.
- Torres, A. (2014). *Plantas como antiveneno: del mito al logos*. Montevideo: Ediciones Universitarias. Universidad de la República.
- Torres, A., & otros. (2015). *Plantas como antiveneno: del mito al logos*. Montevideo: Ediciones Universitarias.
- Torres, L., Álvares, A., & Artigas, J. (2002). *Tratados de cuidados críticos y emergencias II*. España: ARÁN.
- Useful tropical plants. (26 de febrero de 2017). *Useful tropical plants*. Obtenido de <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Tabernaemontana+sananho>
- Valls, J. (17 de marzo de 2016). *Características de resptiles* . Obtenido de [www.reptiles.tuatera.com/reptiles-caracteristicas/](http://www.reptiles.tuatera.com/reptiles-caracteristicas/)
- Villacreses. (14 de enero de 2013). *Morfología y Biología de genero Bothrops*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/juanjoreyesvillacreses/morfologia-y-biologia-de-las-serpientes-del-genero-bothrops>
- Villamarín. (2009). *Accidente ofídico: Manifestaciones y Complicaciones clinicas en pacientes atendidos en el Hospital José María Velazco Ibarra, Tena agosto 2007-mayo 2009*. Tena: ESPOCH.
- Yapuchura. (2010). *repositorio.lamolina.edu.pe*. Obtenido de [repositorio.lamolina.edu.pe](http://repositorio.lamolina.edu.pe):

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1700/TAL%2015-124-TM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Yarlequé, & Clavo. (2012). Acción neutralizante de la toxicidad del veneno de *Bothrops atrox* por extracto de plantas amazónicas. *Scielo Perú*, 234-241.

## Anexos

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de *Minthostachys cf. mollis* (Kunth) Griseb (Kurarina).



Nota: Tomado de Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2016

Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi).

## CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

Los especímenes examinados corresponden a:


### ***Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl
- Familia: Apocynaceae Juss.
- Género: *Tabernaemontana* L.
- Especie: *sananho* Ruiz & Pav.

Nota: Tomado de Herbario Q. C. A. de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2016



Anexo 3. Extracto del permiso de investigación emitido por el Ministerio del Ambiente

 **Ministerio del Ambiente**

**AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

**N° 08-16-IC-FLO-B-DPAMS/MAE**

**FLORA (X) FAUNA ( ) VARIOS ( )**

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:


Investigador/es	C.I/ Pasaporte	Nacionalidad
Q. F. Tapia Hernández Wilson Fabián, investigador principal	CI: 0400942819	Ecuatoriana
Leda Karolys Gutiérrez Germanía Margarita, investigadora adicional	CI: 1708492499	Ecuatoriana
Navarrete Espinel María Andrea, estudiante	CI: 1723923106	Ecuatoriana
Reyes Córdova Michael Xavier, estudiante	CI: 1721592804	Ecuatoriana
Muñoz carrón Ronald Cristian, estudiante	CI: 1722125703	Ecuatoriana
Cueva Pungacho Jenny Verónica, estudiante	CI: 1723447213	Ecuatoriana
Zumba Abdo Magaly Estefanía, estudiante	CI: 1724668874	Ecuatoriana
León Cárdenas Karen Priscila, estudiante	CI: 1725809501	Ecuatoriana

Para que lleven a cabo la investigación científica: **"Actividad Alelítera de Especies Vegetales Amazónicas"**

**De acuerdo a las siguientes especificaciones**

1. Solicitud mediante oficio s/n de fecha 08 de septiembre de 2016, firmado por Q.F. Wilson Tapia H., Ms. DOCENTE INVESTIGADOR UPS, ingresado a la Secretaría del Ministerio del Ambiente de Morona Santiago mediante documento Nro. MAE-DPAMS-2016-1438. Fecha: 2016-09-13 15:15:59 GMT -05. Recibido por: Evelyn Alexandra Jaramillo Zumba; pone a consideración el proyecto de investigación para la aprobación y emisión de la autorización. Mediante oficio s/n se da el AVAL de la Ing. Diana Calero Consuegra, Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito para que el investigador con su equipo de trabajo puedan solicitar la correspondiente autorización.
2. Auspicio de Institución Científica Nacional: Herbario de la Pontificia Universidad Católica de Quito y la Universidad Politécnica Salesiana.
3. Auspicio de Institución Científica Internacional: ninguna
4. Institución que financia la investigación: Universidad Politécnica Salesiana.

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.



Anexo 4. Extracción manual del veneno de serpiente de *B. atrox*



Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 5. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto alcohólico de *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)

Extracto vegetal alcohólico	Diluciones	Tiempo de coagulación (segundos)	Media
<i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb.	1:16	R <sub>1</sub> : 17" R <sub>2</sub> : 18" R <sub>3</sub> : 24"	19,66"
	1:32	R <sub>1</sub> : 13" R <sub>2</sub> : 15" R <sub>3</sub> : 7"	11,66"
	1:64	R <sub>1</sub> : 21" R <sub>2</sub> : 8" R <sub>3</sub> : 4"	11,00"
R=repetición			

Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 6. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto acuoso de *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina)

Extracto vegetal acuoso	Diluciones	Tiempo de coagulación (segundos)	Media	Alexítera
<i>Minthostachys cf. mollis</i> (kunth) Griseb.	1:16	R <sub>1</sub> : 9" R <sub>2</sub> : 9" R <sub>3</sub> : 10"	9,33"	SI
	1:32	R <sub>1</sub> : 5" R <sub>2</sub> : 4" R <sub>3</sub> : 5"	4,66"	SI
	1:64	R <sub>1</sub> : 3" R <sub>2</sub> : 4" R <sub>3</sub> : 5"	4,00"	SI
R=repetición				

Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 7. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto acuoso de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi).

<b>Extracto vegetal acuoso</b>	<b>Diluciones</b>	<b>Tiempo de coagulación (segundos)</b>	<b>Media</b>	<b>Alexítera</b>
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav.	1:16	R <sub>1</sub> : 9" R <sub>2</sub> : 10" R <sub>3</sub> : 7"	8,66"	SI
	1:32	R <sub>1</sub> : 6" R <sub>2</sub> : 3" R <sub>3</sub> : 3"	4,00"	SI
	1:64	R <sub>1</sub> : 4" R <sub>2</sub> : 4" R <sub>3</sub> : 3"	3,33"	SI
R=repetición				

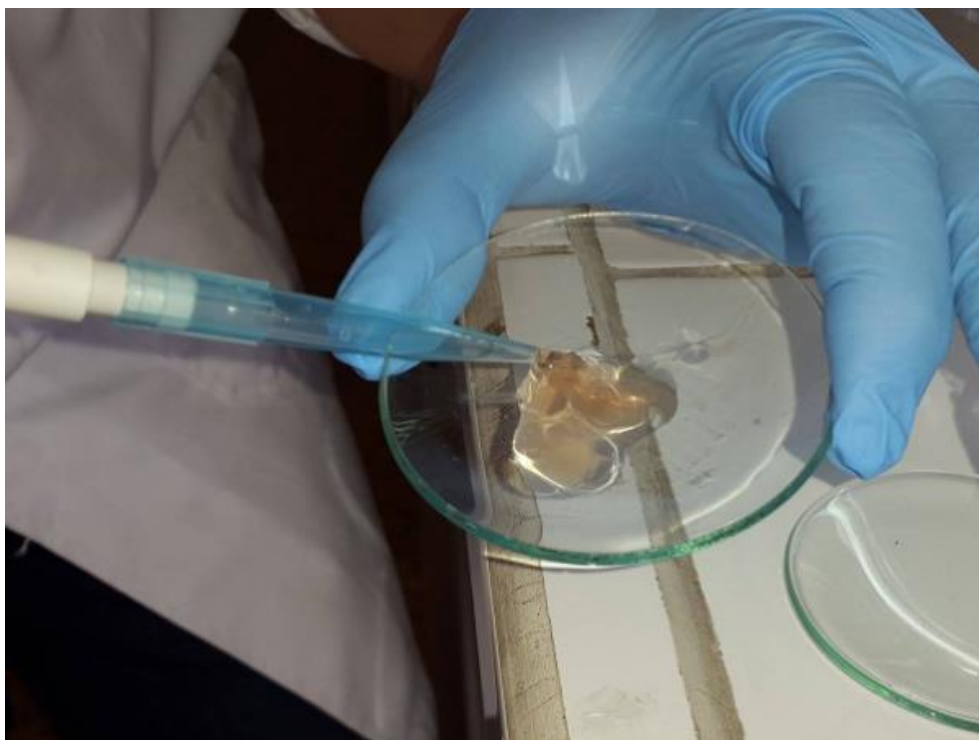
Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 8. Tiempo de coagulación del plasma sanguíneo tratado con mezcla veneno-extracto alcohólico de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi).

<b>Extracto vegetal alcohólico</b>	<b>Diluciones</b>	<b>Tiempo de coagulación (segundos)</b>	<b>Media</b>	<b>Alexítera</b>
<i>Tabernaemontana sananho</i> Ruiz & Pav.	1:16	R <sub>1</sub> : 23" R <sub>2</sub> : 25" R <sub>3</sub> : 21"	23,00"	SI
	1:32	R <sub>1</sub> : 24" R <sub>2</sub> : 18" R <sub>3</sub> : 21"	21,00"	SI
	1:64	R <sub>1</sub> : 20" R <sub>2</sub> : 6" R <sub>3</sub> : 12"	12,66"	SI
R=repetición				

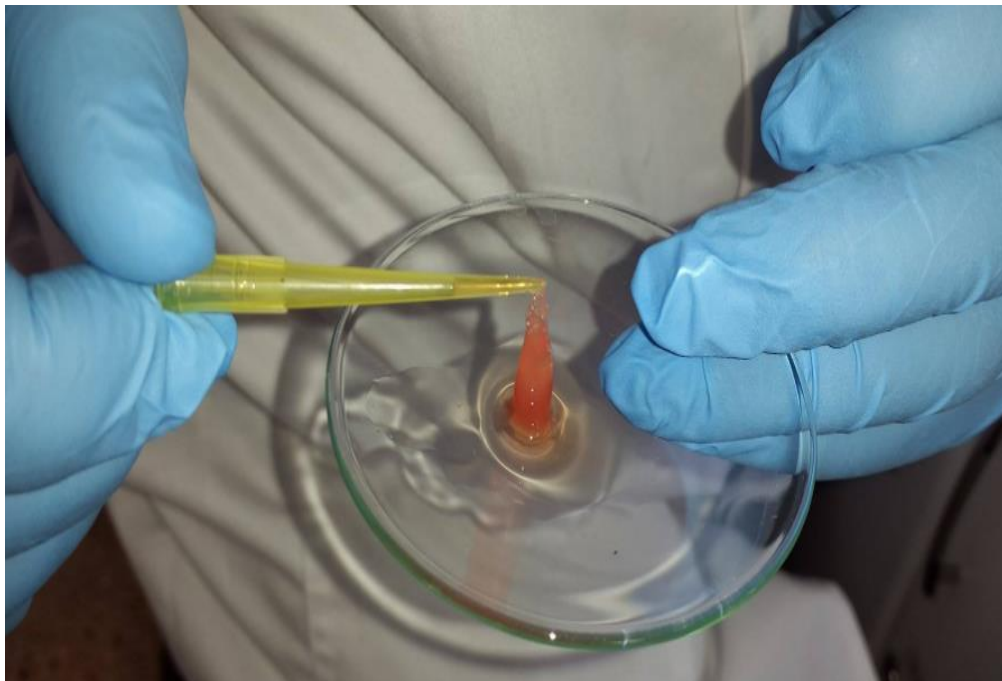
Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 9. Formación del coagulo sanguíneo en extracto acuoso de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi)



Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 10. Formación del coagulo sanguíneo en extracto acuso y alcohólico de *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina).



Nota: Realizado por el autor (2017)



Anexo 11. Absorbancia a 280 nm en extracto acuoso y alcohólico de *Tabernaemontana sananho* Ruiz & Pav. (Kunapi) y *Minthostachys cf. mollis* (kunth) Griseb (Kurarina).

Mode	Sample Name	Comment	280.0 nm
Sample-29		CAS+ATCA	0.1019
Sample-30		CAS+S V	0.2102
Sample-31	14AQ	CAS+VEN+EXT	0.2162
Sample-32	14AQ	CAS+VEN+EXT	0.3434
Sample-33	14AQ	CAS+VEN+EXT	0.2326
Sample-34	12OH	CAS+VEN+EXT	0.6627
Sample-35	12OH	CAS+VEN+EXT	0.6391
Sample-36	12OH	CAS+VEN+EXT	0.3971
Sample-37			10.0000
Sample-38	12AQ	CAS+VEN+EXT	0.7652
Sample-39	12AQ	CAS+VEN+EXT	0.5503
Sample-40	12AQ	CAS+VEN+EXT	0.6312
Sample-41	2AQ	CAS+VEN+EXT	0.3622
Sample-42	2AQ	CAS+VEN+EXT	0.2242
Sample-43	2AQ	CAS+VEN+EXT	0.3920
Sample-44	6AQ	CAS+VEN+EXT	0.5810
Sample-45	6AQ	CAS+VEN+EXT	0.4728
Sample-46	6AQ	CAS+VEN+EXT	0.5084
Sample-47	15AQ	CAS+VE+EXT	0.1487
Sample-48	15AQ	CAS+VEN+EXT	0.0686
Sample-49	15AQ	CAS+VEN+EXT	0.0774
Sample-50	15OH	CAS+VEN+EXT	0.0778
Sample-51	15OH	CAS+VEN+EXT	0.1750
Sample-52	15OH	CAS+VEN+EXT	0.1394
Sample-53	14OH	CAS+VEN+EXT	0.4569
Sample-54	14OH	CAS+VEN+EXT	0.3054
Sample-55	14OH	CAS+VEN+EXT	0.2786
Sample-56	7AQ	CAS+VEN+EXT	0.3321
Sample-57	7AQ	CAS+VEN+EXT	0.4888
Sample-58	7AQ	CAS+VEN+EXT	0.2792
Sample-59	6OH	CAS+VEN+EXT	0.4744
Sample-60	6OH	CAS+VEN+EXT	0.4378
Sample-61	6OH	CAS+VEN+EXT	0.3407
Sample-62	5AQ	CAS+VEN+EXT	0.3572
Sample-63	5AQ	CAS+VEN+EXT	0.2999
Sample-64	5AQ	CAS+VEN+EXT	0.2050
Sample-65	7OH	CAS+VEN+EXT	0.4803
Sample-66	7OH	CAS+VEN+EXT	0.2996
Sample-67	7OH	CAS+VEN+EXT	0.2420
Sample-68	7OH	CAS+VEN+EXT	0.4056
Sample-69	8OH	CAS+VEN+EXT	0.2038
Sample-70	8OH	CAS+VEN+EXT	0.1787
Sample-71	8OH	CAS+VEN+EXT	0.0973
Sample-72	20OH	CAS+VEN+EXT	0.5050
Sample-73	20OH	CAS+VEN+EXT	0.3631
Sample-74	20OH	CAS+VEN+EXT	0.3555
Sample-75	3OH	CAS+VEN+EXT	0.6147
Sample-76	3OH	CAS+VEN+EXT	0.3822
Sample-77	3OH	CAS+VEN+EXT	0.4739
Sample-78	3AQ	CAS+VEN+EXT	0.6644
Sample-79	3AQ	CAS+VEN+EXT	0.6063
Sample-80	3AQ	CAS+VEN+EXT	0.6287

Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 12. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto acuoso de Kurarina.

<b>Extracto acuoso</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Absorbancia a 280 nm</b>	<b>Media</b>	<b><u>Unidades</u> mg</b>
Kurarina	Ext+Cas+Ven	R <sub>1</sub> : 0,2162 R <sub>2</sub> : 0,3434 R <sub>3</sub> : 0,2326	0,2640	-256,19
Ext= Extracto vegetal; Cas= Caseína; Ven= Veneno; R= Repetición, U= Unidades				

Nota: Realizado por el autor 2017

Anexo 13. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto alcohólico de Kurarina

<b>Extracto alcohólico</b>	<b>Componentes</b>	<b>Absorbancia a 280 nm</b>	<b>Media</b>	<b><u>Unidades</u> mg</b>
Kurarina	Ext+Cas+Ven	R <sub>1</sub> : 0,4569 R <sub>2</sub> : 0,3054 R <sub>3</sub> : 0,2786	0,3469	-650,95
Ext= Extracto vegetal; Cas= Caseína; Ven= Veneno; R= Repetición U= Unidades				

Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 14. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto acuoso de Kunapi

<b>Extracto acuoso</b>	<b>Componentes</b>	<b>Absorbancia a 280 nm</b>	<b>Media</b>	<b><u>Unidades</u> mg</b>
Kunapi	Ext+Cas+Ven	R <sub>1</sub> : 0,1487 R <sub>2</sub> : 0,0686 R <sub>3</sub> : 0,0774	0,0982	533,33
Ext= Extracto vegetal; Cas= Caseína; Ven= Veneno; R= Repetición; U= Unidades				

Nota: Realizado por el autor (2017)

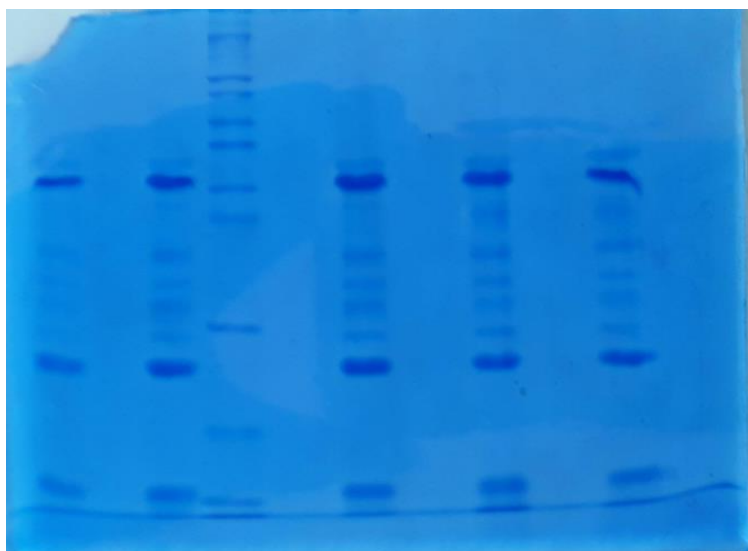


Anexo 15. Proteólisis de caseína por acción de la mezcla veneno-extracto alcohólico de Kunapi

Extracto vegetal alcohólico	Componentes	Absorbancia a 280 nm	Media	Unidades mg
Kunapi	Ext+Cas+Ven	R <sub>1</sub> : 0,0778 R <sub>2</sub> : 0,1750 R <sub>3</sub> : 0,1394	0,1307	378,57
Ext= Extracto vegetal; Cas= Caseína; Ven= Veneno; R= Repetición; U= Unidades				

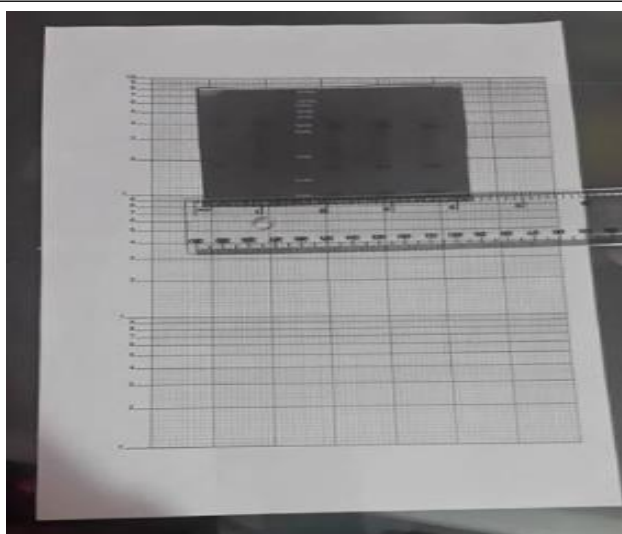
Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 16. Perfil electroforético del veneno de *B. atrox* con y sin tratamientos



Nota: Realizado por el autor (2017)

Anexo 17. Determinación de Pesos Moleculares y  $R_f$ , obtenidos en la Electroforesis.



Nota: Realizado por el autor (2017)